UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR UND FUNKTION DER BALBIANIRINGE VON CHIRONOMUS TENTANS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HEINZ SASS

aus Frankfurt an der Oder

1978

78 371

UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR UND FUNKTION DER BALBIANIRINGE VON CHIRONOMUS TENTANS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

HEINZ SASS

aus Frankfurt an der Oder

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juni 1978

Dekan	:	Professor Dr. K.P. Hadeler
1. Berichterstatter	:	Professor Dr. W. Beermann
2. Berichterstatter	:	Professor Dr. W. Seyffert

Druck: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

INHALT

UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR UND FUNKTION DER BALBIANIRINGE VON CHIRONOMUS TENTANS

A	EINLEITUNG	1 - 3
B	ERGEBNISSE	4
1.	Lichtoptische Morphologie kernverpackter und freier Riesenchromosomen	4
1.1.	Präparation polytäner Kerne	4 - 16
1.2.	Isolation nativer Riesenchromosomen	16 - 20
1.3.	Verhalten nativer Riesenchromosomen in vitro	20 - 28
2.	Elektronenoptische Analyse	28
2.1.	Allgemeine EM-Morphologie der Riesenchromosomen in Ultradünnschnitten	28 - 32
2.2.	Feinbau der Chromomeren	32
2.2.1.	Die Struktur der oligotänen Balbianiring - Teilstränge	32 - 36
2.3.	Untersuchungen an Spreitungspräparaten	36
2.3.1.	Der Fibrillenbau der oligotänen Balbiani - ring - Teilstränge	36 - 38
2.3.2.	Die Struktur der Einzel - Chromatiden	38 - 41
2.3.3.	Die Struktur der Chromomeren	41 - 47
2.3.4.	Die Struktur des Balbianiring 2 - Puffs	47 - 54
3.	Funktion der verschiedenen Struktur- Ele - mente der Chromosomen in vitro	54
3.1.	RNA-Synthese isolierter Kerne	54 - 62

3.2.	RNA-Synthese isolierter Riesenchromosomen	63 - 71
3.3.	Experimentelle Veränderungen des Puff - musters durch DMSO	72 - 81
3.4.	RNA-Synthese der veränderten Puffs in situ und in isolierten Riesenchromosomen	81 - 92
C	DISKUSSION	93
I	Nativ isolierte Riesenchromosomen als Untersuchungsobjekt	93 - 97
II	Ultrastruktur der Riesenchromosomen	97
1.	Banden - Chromomeren	97 - 107
2.	Die Elementarfibrille	107 - 110
3.	Die Balbianiringe als Puffs	110 - 117
III	Steuerung des (BR -) Puffing mittels DMSO	117 - 119
IV	Regulation der RNA-Synthese	119 - 125
D	ZUSAMMENFASSUNG	126 - 129
E	MATERIAL und METHODEN	130 - 135
F	LITERATURVERZEICHNIS	136 - 152

Meinem Lehrer, Herrn Professor Dr. W. Beermann, danke ich für die kritische Durchsicht der Arbeit, wertvolle Ratschläge und die stetige Förderung. Für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen bin ich ihm zu besonderem Dank verpflichtet.

Wertvolle Hinweise bei der Pufflokalisation (Abb. 6) und der Größenbestimmung der BR 2-RNA gab Herr Priv.-Dozent Dr. C. Pelling. Das Können von Frau B. Brand bei der Ultradünnschnitt-Analyse und Herrn Dipl. Biol. M. Claviez bei der Rasterelektronen-Mikroskopie (Abb. 11c) waren hilfreich. Fräulein Koch und Herr Freiberg sorgten für die ordentliche Fertigstellung des Manuskriptes und der Zeichungen.

Meiner Mutter, Frau Käthe Sass, im besonderen gilt mein Dank für die großzügige finanzielle Unterstützung 1977/78.

Teile dieser Arbeit wurden 1978 bei der Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie im Max-Planck-Institut für Zellbiologie in Ladenburg vorgetragen.

A EINLEITUNG

Charakteristisches Merkmal polytäner Chromosomen ist das durch aperiodisch aufeinanderfolgende Abschnitte unterschiedlicher Massendichte gebildete Querscheibenmuster. Koltzoff (1934) postulierte als erster, die Speicheldrüsen-Chromosomen von Chironomus und Drosophila seien aus homologen Einzelchromatiden zusammengesetzt; Bauer (1935, 1936) und Bridges (1935) haben die Richtigkeit dieser Hypothese bewiesen. 1938 ordnete Muller auf Grund theoretischer Überlegungen dieser elementaren Fibrille, der Chromatide, maximal 200 A Durchmesser zu. Kontrovers sind bis heutzutage die Ansichten über die tatsächlichen Fibrillendimension. 100 - 300 A Durchmesser werden diskutiert (s. Ris, 1969; Wolfe, 1969; Ris und Kubai, 1970; Huberman, 1973; Ris, 1975; Felsenfeld, 1978).
Der DNA-Gehalt in den Banden und Zwischenbanden variiert beträchtlich; höchstens 5 % der DNA befinden sich in den Zwischenbanden (Beermann, 1972). Da die DNA jeder Chromatide als langes Fadenmolekül vorliegt, das die Chromosomenlänge bei weitem übertrifft (Kavenoff und Zimm, 1973), so ist ein unterschiedlich strukturelles Arrangement der Chromatide in den Banden und Zwischenbanden zu erwarten. Ris und Crouse (1945) haben zuerst, später auch andere, z.B. Beermann (1959) die Hypothese vertreten, daß das einzelne Chromomer, als kleinste Struktureinheit polytäner Chromosomen, durch die differentielle Knäuelung der Chromatide im Bandenbereich entsteht.

Phasen genetischer Aktivität und Inaktivität führen zu anderem Verhalten der Chromatide. An Stelle kondensierter Querscheiben bzw. Banden entstehen lokal begrenzte Anschwellungen wechselnden Ausmaßes, die man seit ihrer Beschreibung bei Sciara coprophila durch Poulson und Metz (1938)

traditionell "puffs" nennt. Schon Balbiani (1881) äußerte bei seiner Schilderung der Speicheldrüsen-Chromosomen von Chironomus, daß deren Riesenpuffs "renflement discoïde" - später zu Ehren Balbianis als dem Entdecker der Riesenchromosomen Balbianiringe genannt - sich in ihrer stofflichen Zusammensetzung von anderen Chromosomenabschnitten unterscheiden. BR 2 als größter Puff im Speicheldrüsen-Genom von Chironomus tentans enthält 75 mal mehr RNA als Nicht-BR-Puffs (Edström et al., 1978).

Unentschieden ist allerdings noch immer der genaue strukturelle Aufbau der Balbianiringe und welcher Mechanismus die Entstehung der Balbianiringe und anderer Puffs steuert.

Zwei Hypothesen zum Problem des Puffing gibt es:

a) Puffing ist das Resultat des Transkriptionsprozesses selbst. Es ist vermutlich bedingt durch die Anhäufung z.B. von Verpackungsproteinen, sowie der kurzfristigen Akkumulierung von Transkriptionsprodukten (s. Beermann, 1966, 1967).

b) Puffing ist die Voraussetzung für die Initiation der RNA-Synthese. Erst durch den Dekondensationsprozeß wird die DNA des Chromomers von assoziierten Proteinen befreit, sodaß sie den RNA-Polymerasen zur Verfügung steht und diese transkribieren können (s. Pelling, 1966, 1969, 1972).

Bisher zur Verfügung stehende Arbeitsweisen erlaubten die endgültige Klärung des Zusammenspiels von Chromosomenstruktur und -Funktion nicht. Um herauszufinden, in welcher Weise Puffing und RNA-Synthese ursächlich miteinander verbunden sind, war es notwendig: (1) Genetische Informationsträger intakt und nativ aus Speicheldrüsen zu isolieren. (2) Anhand von Ultradünnschnitten und Spreitungspräparaten eine genauere Kenntnis von der submikroskopischen Struktur transkriptionell tätiger und untätiger Genloci in situ, d.h. in Speicheldrüsen und im zellfreien System befindlicher Riesenchromosomen zu haben. (3) Genaktivitäten in vivo so verändern zu können, daß es im Fall positiver transkriptioneller Regulation

zur gesteigerten RNA-Synthese kommt und im Fall negativer transkriptioneller Regulation die Aktivität einzelner Gene unterbindet. (4) Das aktuelle BR-(Puff-)Muster, welches gerade im Tier vorliegt, in vivo zu studieren. Zum anderen isolierte Speicheldrüsen-Chromosomen mit gleichem BR-(Puff-)Muster, in unterschiedlichem Ionenmilieu und dementsprechend abgewandelter Struktur im zellfreien System radioaktiv zu markieren, um sie den im Tier markierten Chromosomen gegenüberzustellen.
In der vorliegenden Untersuchung werden solche Möglichkeiten (I-IV) und die Befunde sowie Schlußfolgerungen beschrieben.

B Ergebnisse

1. Lichtoptische Morphologie kernverpackter und freier Riesenchromosomen

1.1. Präparation polytäner Kerne

Explantierte, ganze Speicheldrüsen von Chironomus tentans sind relativ kompakt gebaut und lassen sich deshalb nicht direkt spreiten. Störend ist auch das klebrige, visköse Sekret im Drüsenlumen. Deshalb wurde zunächst versucht, die Spreitung der Chromosomen an isolierten Kernen vorzunehmen.

In der Literatur sind zahlreiche Methoden, Kerne zu isolieren, ausführlich beschrieben, vgl. Behrens (1932), Busch (1967) und Muramatsu (1970), doch allein die Vielfalt dieser Methoden verdeutlicht bereits, daß die Isolationstechniken auf die jeweils untersuchten Organe oder Gewebe abgestimmt werden müssen. Ein allgemein verwendbares Isolationsmedium gibt es nicht. Zunächst soll daher ein IS-Verfahren beschrieben werden, das sich für die Isolation der Speicheldrüsen-Kerne von Chironomiden als günstig und im Vergleich zu der von Robert (1971) entwickelten Methodik für die Isolation und Manipulation auch von nativen Riesenchromosomen (s 1.2.) als besser geeignet erwies.

Folgende Kriterien wurden bei der Ausarbeitung der IS-Medien beachtet:

1. Die Kerne sollten bei möglichst geringer Verunreinigung mit Speichelsekret in großer Zahl aus den Kerntaschen der Drüsenzellen herauszulösen sein.
2. Dimension und Morphologie der Kerne, sowie die Struktur der kernverpackten Chromosomen und ihrer Syntheseprodukte (RNP) sollten annähernd der in vivo-Situation entsprechen.
3. Die Fähigkeit der isolierten Kerne zu biologischer Aktivität, d.h. zur Transkription und Replikation sollten erhalten bleiben.

Die Isolation fand in einem wässerigen Salzmilieu statt, das nur die im Kationenhaushalt des Zellkernes am häufigsten vertretenen Elektrolyten: Na^+, K^+, Mg^{++}, Ca^{++} (Langendorf et al. 1961; Naora et al. 1961) enthält. Die Bestimmung der optimalen Konzentration erfolgte nach morphologischen Kriterien, d.h. sie richtete sich nach den beobachteten Änderungen der Kernstruktur in explantierten Speicheldrüsen als Folge der Einwirkung verschiedener Kationen in wechselnder Konzentration (vgl. Tab. 1, I-IX). Die folgende Zusammensetzung hat sich als optimal erwiesen und dient als Standard-IS-Medium:

NaCl: 8 mM; KCl 90 mM; $MgCl_2$: 0,5 mM; $CaCl_2$: 0,5 mM; Na_2HPO_4/KH_2PO_4: 15 mM; NONIDET P 40: 0,2 % pH 6.0.

Phosphatpuffer in einer Konzentration von 15 mM verringert wegen seines chelatisierenden Charakters die Viskosität des durch 2^+-Elektrolyten (wie z.B. Mg^{++}, Ca^{++}) vernetzten Speichelsekrets, was eine hohe Ausbeute an Kernen erlaubt (s.u.). Durch Zusatz des stärker chelatisierenden Äthylendiamino-tetra-acetat (EDTA; 1 mM) kann die Viskosität des Sekretes noch stärker herabgesetzt werden. In der Regel wurde jedoch auf die Verwendung von EDTA in den IS-Medien verzichtet, da es gleichzeitig den Erhaltungszustand der Ribonukleoproteine (RNP) ungünstig beeinflußt. Dies geschieht vor allem durch die Komplexierung von Magnesium.

Der pH des Standard-IS-Mediums wurde auf den Wert 6.0 eingestellt. In diesem schwach sauren pH-Bereich besitzen die Kerne eine festere Struktur als in vivo bei 18°C, wodurch sie weitaus besser gegen mechanische Beschädigungen geschützt sind, als im schwach alkalischen pH-Bereich. Bei pH 6.8 (in 0,1 mM PIPES) oder pH 7.0 (in 0,1 mM HEPES) isolierte Kerne sind weniger kompakt und leicht verletzlich. Die Isolationsprozedur

Komponenten/Medien	I +	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Monovalente Ionen: KCl	90	110	110	110	90	90	90	9,0	0,9
Monovalente Ionen: NaCl	8	5	5	5	5	5	5	5,0	0,5
Bivalente Ionen: $MgCl_2$	0,5	0,5	0,5	0,5	6,0				
Bivalente Ionen: $CaCl_2$	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0				
Ionenstärke (μ) Berechnet wurden Na, K, Mg, Ca in MOL	0,118	0,118	0,118	0,118	0,113	0,263	0,112	0,014	0,007
Puffersubstanzen									
Na_2HPO_4/KH_2PO_4	15				15	150	15		5,0
M E S		0,1							
P I P E S			0,1					0,1	
H E P E S				0,1					
pH	6,0	6,0	6,8	7,0	6,0	6,0	6,0	6,8	6,0
Detergens NONIDET P 40	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %
Ä D T A						10			1,0
Kernvolumen	N O R M A L				N O R M A L		NORMAL	G E Q U O L L E N	
Chromosomen-morphologie	K O N D E N S I E R T				ÜBERKONDENSIERT		KONDEN-SIERT	G E Q U O L L E N	
Sekretzustand	VISKÖS - FLÜSSIG				KONDENSIERT		F L Ü S S I G		

+= Standard-IS-Medium: PIPES: Piperazin-N, N'-bis (2-Äthansulfonsäure); MES: 2-N-Morpholinopropansulfonsäure
HEPES: N-2-Hydroxäthylpiperazin-N-2-Äthansulfonsäure
ÄDTA: Äthylendiaminotetraessigsäure.

Falls nicht anders vermerkt, alle Konzentrationsangaben in mM (10^{-3})

Tab. 1:
Chemische Zusammensetzung und Wirkungsweise verschiedener Kern-Isolations-Medien auf die larvalen Speicheldrüsen von Chironomus tentans.

ergibt dann häufig deformierte Kerne mit geschädigten, meistens überdehnten Riesenchromosomen. Zugleich wird bei pH 6.0, in Kombination mit einem grenzflächenaktiven Agens (s.u.), das Verklumpen der isolierten Zellkerne miteinander und das Kleben an Gefäß- und Gerätwandungen verhütet. Schließlich werden bei pH 6.0 nur wenig Nicht-Histon-Proteine extrahiert, während nach Spelsberg und Hnilica (1971) bei pH 8.0 ein beträchtlicher Anteil der Histone in Lösung geht. Auch niedrigere pH-Werte zwischen 2 - 4, wie sie von einigen Arbeitsgruppen für die Isolation von Metaphasechromosomen bevorzugt werden (eine zusammenfassende Darstellung geben Hearst und Botchan (1970)), wurden vermieden. Es zeigte sich, daß bei pH 2 - 4 auch Nicht-Histon-Proteine aus polytänen Chromosomen entfernt werden.

Für die Isolationsprozedur als solche, wie für die Reinigung der freien Kerne von cytoplasmatischen Verunreinigungen ist die Gegenwart eines nicht-ionogenen Detergens im IS-Medium absolut notwendig. Von den getesteten Detergentien: Triton X-100; Brij 58; Digitonin; SPS-15 (Serva -Heidelberg), erwies sich NONIDET P 40 als am besten geeignet. NP 40 ist ein Isooctylphenol, chemisch in seiner Struktur ähnlich Triton X-100 und von diesem lediglich in der Anzahl der Äthylenoxidgruppen der Seitenketten unterschieden, (Shell Chemical Co.). Der Effekt ist deutlich von der Konzentration und der Einwirkungsdauer abhängig. Mit 0,2%, welche für die Isolation am günstigsten waren, ist nach 20 Minuten Vorbehandlung bei 1-2°C eine saubere Kernfraktion zu gewinnen. Unter gleichen Bedingungen, aber mit 0,01 % NONIDET, sind die Kerne (wie in Abb. 1a sichtbar) stets mit nichtlysierten Zellen umgeben. Die Einwirkungsdauer des Detergens muß auf 50 - 60 Minuten verlängert werden, um Kerne von gleichem Reinheitsgrad wie bei 0,2 % (in 20 Min.) zu isolieren.

Derartige lange Inkubationszeiten verschlechtern aber das morphologische Erscheinungsbild der Riesenchromosomen. Auf der anderen Seite verkürzen NP-40 Konzentrationen über 0,2 % die notwendige Präinkubation nur unwesentlich, beeinträchtigen aber dann wiederum den Erhaltungszustand der Chromosomen. 1-5 % NONIDET P 40 im Standard-IS-Medium induzieren eine extreme Kondensation der Riesenchromosomen. Von ähnlichen Effekten berichten auch Tata et al. (1972) für das dem NP-40 chemisch verwandte Triton X-100 bei Rattenleber-Chromatin. Ionische Detergentien wie Natriumlaurylsulfat oder Desoxycholat, die Ristow und Arends (1968) als geeignet empfehlen, verändern die Kern- und Chromosomenmorphologie, verglichen mit deren in situ-Erscheinungsbild jedoch erheblich. Ein Zusatz von Saccharose in isotonischer Konzentration erwies sich für die Speicheldrüsen von Chironomus wegen der Zucker-induzierten Sekret- und Cytoplasmaverhärtung ebenfalls als nicht günstig. Diese Verhärtung kann auch durch Detergenseinfluß nicht beseitigt werden.

In einigen Fällen wurde der Phosphatpuffer im Standard-IS-Medium durch nicht Metall-bindende Puffer ersetzt (vgl. Tab. 1, Med. II-IV), um eventuell mögliche, aus dem Entzug von Metallionen resultierende Strukturabwandlungen des Chromatins auszuschließen; Ris und Kubai (1970); Ris (1975) berichten von signifikanten Schwankungen des Chromatin-Fibrillendurchmessers im elektronenoptischen Bild unter PO_4-Einfluß. Als gute Alternativen zum PO_4-Puffer haben sich die von Good et al. (1966) entwickelten Hydrogenion-Puffersubstanzen PIPES (Piperazin-N, N'-bis (2-Äthansulfonsäure, pK 6.8); MES (2-N-Morpholinopropansulfonsäure, pK 6.15) und HEPES (N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N-2-Äthansulfonsäure, pK 7.55) erwiesen. PIPES und HEPES binden überhaupt keine Metalle, lediglich MES ist durch eine sehr kleine Metall-Puffer-Bindungskonstante charakterisiert. Chemisch handelt es sich bei diesen Puffern um zwitterionische Aminosäuren. Es ist jedoch nicht günstig, diese organischen Puf-

fer in gleicher Konzentration wie den anorganischen Phosphatpuffer (15 mM) einzusetzen, da das aus nicht geklärten Gründen häufig dazu führt, daß die kernverpackten Riesenchromosomen während der Drüsenpräinkubation zu einem Knäuel kollabieren. Als geeignet erwies sich die bereits von Wray und Stubblefield (1970) für die Isolation der Metaphasenchromosomen aus Kernen von Hamster-Fibroblasten verwendete Konzentration von 0,1 mM PIPES bzw. MES und HEPES in einem Ionenmilieu, das im übrigen dem des Standard-IS-Mediums entspricht.

Das Drüsensekret bleibt in diesen GOOD-Puffern bei einer Konzentration von 0,1 mM viskös. Von praktischer Bedeutung ist die Beobachtung, daß bei Verwendung der genannten Puffer, verbunden mit einer relativ hohen Magnesiumkonzentration (4 mM) und Calciumchlorid (1 mM) das Speichelsekret im Drüsenlumen zu einem kompakten Pfropf verfestigt wird, ohne daß dabei die Morphologie der Riesenchromosomen nachteilig verändert wurde. Diese selektive Sekretverfestigung erlaubt es auf einfache Weise, kontaminationsfreie Kerne zu isolieren, was vor allem für die chemische Analyse der chromosomalen Proteine von Vorteil sein sollte.

In einem typischen Experiment werden die Drüsen-Paare von 20 - 30 Larven der Stadien 3 und 4 explantiert, in 2 ml eiskalten IS-Mediums übertragen und darin für 20 Minuten bei 1 - 2°C inkubiert. Ein vorheriges Zerkleinern der Drüsenkörper empfiehlt sich wegen des hohen, viskösen Sekretanteils nicht und erübrigt sich, da die leichtdurchlässige Membran der Drüsen eine rasche Medieneinwirkung gestattet. Nach einer Präinkubation von 20 Minuten werden die Speicheldrüsen in kurzen Zeitabständen (2 - 3 Min.) durch wiederholtes Pumpen (2 - 4 mal) mit einer silikonisierten, mehrfach gebogenen Pasteurpipette aufgelockert. Da-

BR2
NO
a
NO
NO
b
NO
NO
c
NO
α-HET
d

Abb. 1:

Nativ isolierter Speicheldrüsen-Kern von Chironomus pallidivittatus. Die Kern- und Chromosomen-Morphologie stimmt mit derjenigen in situ, also in Speicheldrüsen vorhandenen, gut überein, jedoch sind bei zu gering gewählter Detergenskonzentration (0,01 % an Stelle der als optimal ermittelten 0,2 % NONIDET P 40) die Kerne stets mit nicht lysiertem Zellmaterial kontaminiert.
b-d) In weniger als 30 Sekunden unmittelbar aufeinander folgende Konformationsabwandlungen nativ isolierter Kerne von Chironomus tentans in niedrigem Salz (30 - 20 mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl, pH 7.3). Lediglich die Nukleolen und vakuolisierte Heterochromatin-Blöcke bleiben im Falle maximaler Kern-Expansion noch sichtbar; die Riesenchromosomen sind strukturlos.
Phasenkontrast. Maßstab 10 µm.

durch gelingt es, die etwa 40 Kerne jeder Speicheldrüse (vgl. Abb. 2d - Inset) in einer Ausbeute von 85 - 100 % freizusetzen. Die isolierten Kerne erscheinen licht- und elektronenoptisch frei von cytoplasmatischen Verunreinigungen. Bei der Betrachtung der Kerne im Phasenkontrast (Abb. 1a - d) zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung ihres Erscheinungsbildes mit demjenigen in situ, trotz der eben dargestellten Vorbehandlung und notwendigerweise relativ groben, mechanischen Belastungen. Eine Quellung oder Schrumpfung ist nicht festzustellen. Die meisten isolierten Kerne sind von ungefähr kugelförmiger Gestalt. In Larven der Stadien 3 und 4 liegt ihr Durchmesser zwischen 30 - 100 µm (s. Blockdiagramm Abb. 2), wogegen für die Stadien 1 und 2 Durchmesserwerte von 6 - 24 µm kennzeichnend sind. Diese Daten stimmen mit den Kerngrößen in den Drüsen, s. Beermann (1952), gut überein.

Die kernverpackten Riesenchromosomen bewahren in diesem Ionenmilieu ihr charakteristisches, gebändertes Aussehen. Ihr Querschnitt schwankt zwischen 7 - 15 µm. Auch die Länge der Chromosomen scheint den Normalwerten zu entsprechen, doch ist diese wegen der Überlage-

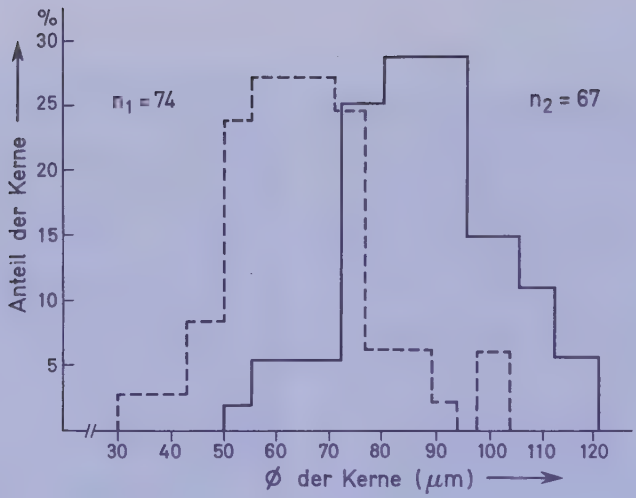


Abb. 2:

n_1: Größenverteilung der im Standard-Medium, d.h. unter annähernd isotonischen Bedingungen (s. Tab. 1), nativ isolierten Speicheldrüsen-Kerne von Chironomus tentans (Larvenstadium 4)

n_2: Größenverteilung der in einem hypotonischen Medium (Tab. 1, VIII) nativ isolierten Speicheldrüsen-Kerne (Larvenstadium 4)

rung der Chromosomen in mehreren Ebenen schwieriger zu bestimmen.

Nach der Fixierung in Äthanol-Eisessig (3:1) und dem Quetschen in Karminessigsäure bieten die Kerne bzw. die Chromosomen ein morphologisches Erscheinungsbild, das dem in gewöhnlichen Drüsen-Quetschpräparaten annähernd vergleichbar ist.

Verwendet man an Stelle des Standard-IS-Mediums Salzlösungen höherer sowie niedrigerer Ionenstärke (s. Tab. V - IX), dann zeigen die freigesetzten Speicheldrüsen-Kerne medienspezifisch, unterschiedliche Veränderungen der Kerndimension und Kerninnenstrukturen. In einem Ca^{++}, Mg^{++}-freien Ionenmilieu, dessen Ionenstärke gleichzeitig fast doppelt so

hoch ist (= 0,26 M) wie die des Standard-Mediums (= 0,118 M), sind die äußeren Dimensionen der Kerne kaum verändert. Auffällig ist die intensive Vakuolisierung der Nukleolen (NO) und die ungewöhnliche Transparenz der Balbianiringe. In den BR sind die verästelten Oligotänfibrillen gut erhalten. Die normal lichtoptisch dichtere, diffuse Zone an der Peripherie der Balbianiringe, wie in Abb. 10 erkennbar, ist verloren gegangen. Veränderungen der übrigen Chromosomenstruktur sind weniger deutlich. Im elektronenoptischen Bild bestätigt sich, daß die Nukleolen-Vakuolisierung, sowie der geringe Balbianiring-Kontrast auf den Verlust von RNA, Proteinen bzw. Ribonukleoproteinen (RNP) zurückgehen. Vor allem fehlen in den Balbianiringen 1 und 2 die in Abb. 18, 20 sichtbaren charakteristischen RNP-Grana.

Eine Verringerung der Ionenstärke auf 0,02 M KCl (NaCl) oder weniger, wirkt sich noch drastischer auf die Kernstruktur aus. In weniger als 60 Sekunden nach Einbringen der explantierten Speicheldrüsen in dieses Ionenmilieu kommt es zu einer beträchtlichen Schwellung der Kerne, welche auch die isolierten Kerne beibehalten. Die vollständige Verquellung der Chromosomen füllt den Kernraum vollständig aus und macht die Identifikation einzelner Riesenchromosomen unmöglich. Lediglich die Nukleolen und einzelne, nach morphologischen Kriterien, z.B. die Vakuolisierung und vielleicht als heterochromatisch anzusprechende Strukturen, heben sich stets deutlich von dem homogen, strukturlosen Kerninnern ab (Abb. 1d). Das Maximum der induzierten Schwellung liegt bei den größten Kernen bei etwa 120 um Durchmesser (vgl. Blockdiagramm, Abb. 2). Eine Verlängerung der Inkubation um 5 - 10 Minuten führt zu keiner weiteren Ausdehnung der Kerne, eher beginnt deren Größe allmählich abzunehmen. Werden solche in niedrigem Salz (0,02 M KCl oder NaCl) dekondensierten Kerne abzentrifugiert, anschließend mit einer Salzlösung mittlerer Ionenstärke (0,14 M

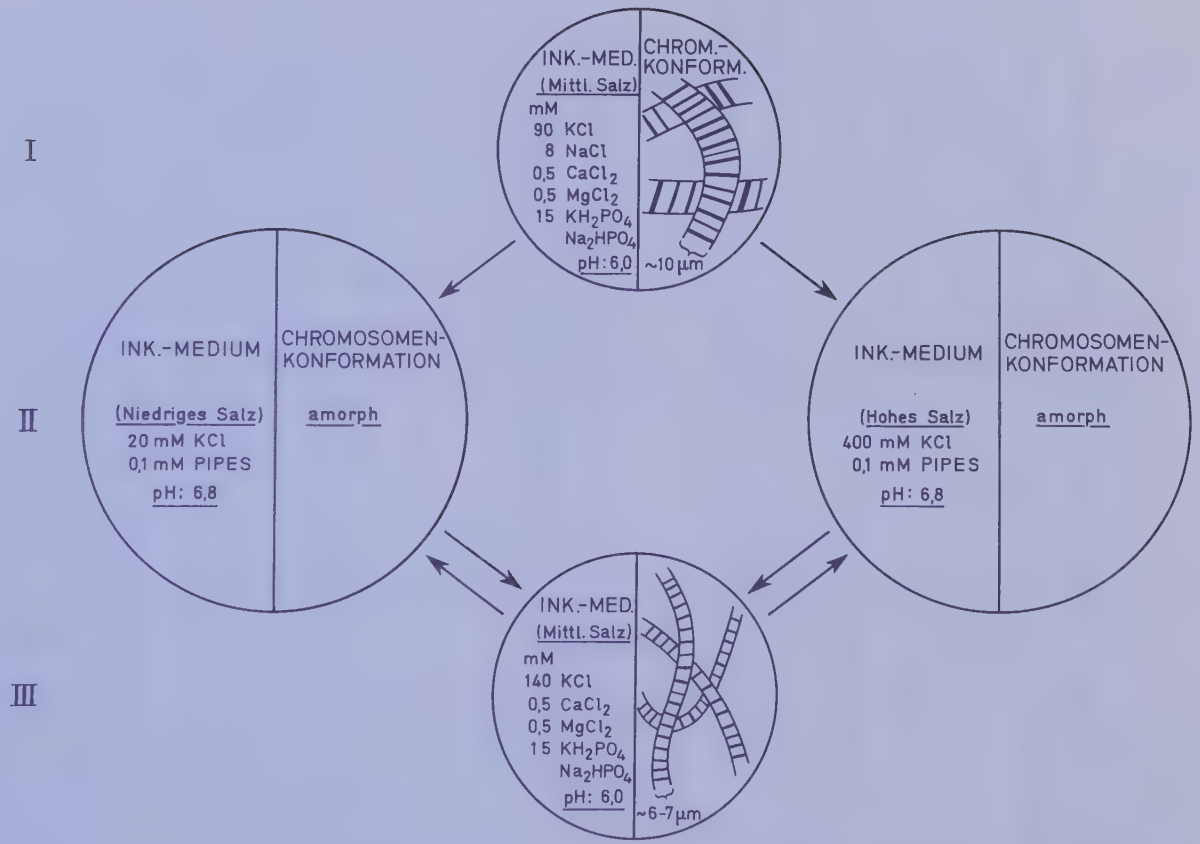


Abb. 3:
Schematische Darstellung des Verhaltens polytäner Kerne in niedrigem und hohem Salz. Nativ isolierte Speicheldrüsen-Kerne (I) von Chironomus tentans können nach maximaler Expansion (II) ihre normale Konformation (I) nicht mehr einnehmen. Hingegen sind Konformationsänderungen nach II⇌III, 3-5x im Wechsel induzierbar. Bei jeder Rekondensation ergibt sich auf Grund von Substanzverlusten ein geringerer Chromosomendurchmesser; schließlich unterbleibt jegliche De-

KCl oder NaCl überschichtet und dadurch rekondensiert (s. Abb. 3), dann erscheinen die Riesenchromosomen wieder, aber als sehr schmale, stark kondensierte Strukturen. Das De- und Rekondensieren kann 3 - 5 mal wiederholt werden, wobei die Reaktionsfähigkeit aber ständig abnimmt, sodaß die Kerne ein immer geringeres Volumen erreichen. Diese Tatsache, zusammen mit der starken Reduktion des Chromosomendurchmessers deutet auf einen Substanzverlust der Kernstrukturen. Hierbei sollten hauptsächlich heterogene Nicht-Histone-Proteine betroffen sein, da nach den Befunden von Ohlenbusch et al. (1966) die selektive Dissoziation der Histone vom Chromatin erst bei einer Ionenstärke von 0.5 - 0.6 M NaCl einsetzt. Im Standard-IS-Medium bei einer annähernd physiologischen Ionenstärke von 0.12 M gewonnene Kerne überstehen dagegen die Drüsenpräinkubation (20 Min.) und die Kernisolation ohne sichtbare Schädigung ihres polytänen Chromatins.

Spreitungsexperimente mit den isolierten Kernen hatten keinen Erfolg, da die Kernmembran ungewöhnlich stabil ist. Diese Stabilität ist selbst dann noch gegeben, wenn man die Kerne unmittelbar vor dem Spreitungsexperiment in bidestilliertem Wasser zum Quellen (1/2 - 1 Min.) und anschließend auf eine wässerige, salzfreie Hypophase (pH 7 - 8,5) bringt. Vielleicht ist die hohe Membranstabilität eine Besonderheit von polytänen Kernen. Mazeriert man die Kernmembran mit Harnstoff (10 M) und Natronlauge (0,5 M), 1:1 für 1 - 3 Minuten, so wie ursprünglich von Calvin et al. (1940), Painter (1941) und neuerlich von Derksen und Sorsa (1972) für ganze Drosophila-Speicheldrüsen angewandt, so gelingt es mitunter, die Kerne bzw. Riesenchromosomen zu spreiten. Allerdings beseitigen Harnstoff und NaOH gleichzeitig die Ribonukleoproteine, was eine Interpretation der Befunde erschwert. Deshalb wurde dieses Verfahren

nicht weiter verwendet.

1.2. Isolation nativer Riesenchromosomen

Fast alle in der Literatur beschriebenen Verfahren der Chromosomenisolierung beziehen sich auf Metaphase-Chromosomen. Der Versuch, Riesenchromosomen mikrurgisch mit Nadeln aus dem Kern durch den Drüsenkörper herauszuziehen (D'Angelo, 1946; Lezzi, 1962) ergibt nur wenige Chromosomen. Lediglich die von Boyd et al. (1968); Robert (1971); Lezzi und Robert (1972) entwickelte Methodik erlaubt eine höhere Ausbeute. Allerdings ist bei diesem Verfahren die Manipulation freier Riesenchromosomen kompliziert und der chromosomale Erhaltungszustand für die hier gewünschten Experimente nicht immer befriedigend, vgl. Robert (1975). Aus diesen und den bereits genannten Gründen (s.o.) wurden Versuche unternommen, aus freien Speicheldrüsen-Kernen native Riesenchromosomen zu isolieren. Dabei sollten die folgenden, auch für die Kernisolation geltenden Forderungen erfüllt sein:

1. Neben einer hohen Ausbeute sollte die strukturelle Integrität der freien Riesenchromosomen weitgehend dem in vivo-Zustand entsprechen.
2. Die Fähigkeit der Riesenchromosomen zu transkribieren und zu replizieren, sollte erhalten bleiben.

Grundsätzlich gilt, daß die Isolation der Riesenchromosomen nur bei ganz bestimmten Salz-Kombinationen und- Konzentrationen möglich ist; bereits die morphologischen Indizien machen die Bedeutung einer sorg-

fältigen Medienzusammenstellung offensichtlich. Gequollene Kerne können wegen der "weichen" Chromosomenstruktur und hohen Elastizität der Kernmembran nicht verwendet werden. Besser eignen sich Kerne mit einer spröden, stark kondensierte Riesenchromosomen umschließenden Membran. Allerdings erlauben die für die Härtung benötigten verhältnismäßig hohen Magnesiumkonzentrationen (3 - 4 mM), wegen der zusätzlichen Verfestigung der Kernmembran nur wenig Ausbeute.

Wie Abb. 4 zu entnehmen ist, sind im Konzentrationsbereich unter 0,03M KCl die Riesenchromosomen dekondensiert, bei 0,09 M KCl im 15 millimoloren Phosphatpuffer (bei pH 6.0 ohne Detergens) kondensiert, während bei 0,45 M KCl die Chromosomen den gleichen Quellungszustand wie in niedrigem Salz einnehmen. Demzufolge sind monovalente Kationen in einer Konzentration von ca. 100 mM KCl/NaCl im 15 mM PO_4-Puffer, die für die Erhaltung des chromosomalen Kondensationszustandes genügt, Hauptbestandteil des IS-Mediums. Schon solche Puffer ohne zweiwertige Kationen können in Verbindung mi 0,2 % NONIDET P 40 für die Isolation der Riesenchromosomen verwendet werden. Fügt man geringe Mengen Mg^{++} und Ca^{++} (je 0,5 mM) für die höhere Stabilität der Ribonukleoproteine hinzu, so gleichen sich das Kern- und Chromosomen-IS-Medium in ihrer chemischen Zusammensetzung. Für die Präparation befinden sich 2 - 5 ml des IS-Mediums in silikonisierten Uhrgläschen, die auf einem Kühltisch ständig auf 1 - 2°C temperiert werden. Für das Gelingen der Chromosomen - Isolation ist die Silikonisierung von besonderer Bedeutung, da andernfalls die Drüsen ebenso wie die Kerne und Chromosomen sehr leicht an den Glasgeräten haften. Zur Silikonisierung diente in erster Linie DESICOTE (Beckman - München). Allein durch Überwischen bzw. Einsaugen von DESICOTE und nachfolgendes Ab- bzw. Ausspü-

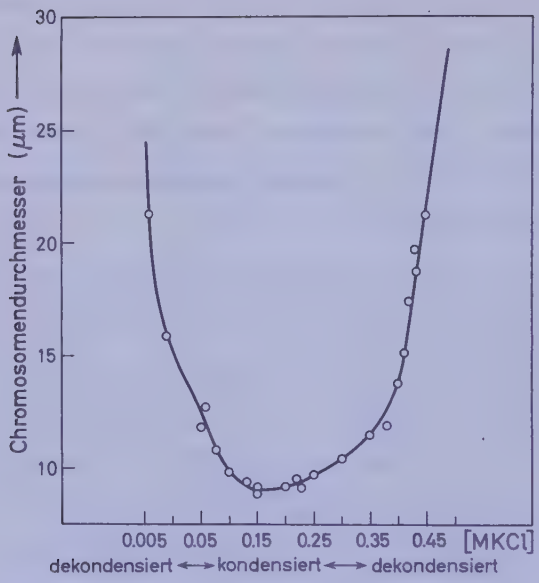


Abb. 4:

Der Kondensationszustand kernverpackter Riesenchromosomen in Abhängigkeit von der Ionenstärke (bei pH 6.0 in 15 mM Na_2HPO/KH_2PO_4 -Puffer). Je 3-5 Messungen nahezu gleich großer Chromosomen ergeben die eingezeichneten Punkte.

len der organischen Silikonlösung mit Wasser oder Aceton sind die Glassachen ausreichend präpariert.

Die Isolation der (Kerne und) Riesenchromosomen erfolgt im gleichen Gefäß. Zunächst werden die polytänen Kerne, wie in Kap. 1.1. ausgeführt, durch Pumpen mit einer Pasteurpipette freigesetzt. Um die Masse der Riesenchromosomen zu isolieren, läßt man das Medium 2-5 Min. auf die freien

Kerne einwirken. Das führt, wie elektronenoptische Bilder zeigen, zu einem stärkeren Abbau der äußeren Kernmembran. Nach der Vorbehandlung erfolgt ein mehrmaliges Einsaugen und Ausstoßen der Kerne mittels einer mehrfach abgebogenen Pasteurpipette mit verengter Öffnung (ca. 0,5 mm). Diese Modifikation der Pipette ist notwendig, damit die Kerne möglichst häufig auf die Glaswandung auftreffen. Zusammen mit der in der verengten Pipettenspitze erzeugten, zusätzlichen mechanischen Belastung der Kerne gelingt es, die Kernmembran aufzureißen und ca. 40 % der Riesenchromosomen aus den Kernen freizusetzen. Die Ausbeute kann innerhalb von 5 - 10 Minuten durch wiederholtes Pumpen bis auf 70 % gesteigert werden. An Stelle der Pasteurpipetten kann man auch einen gläsernen Dounce-Mikrohomogenisator verwenden. Die bereits beim ersten Pumpen freigesetzten Riesenchromosomen werden wegen ihrer geringen Größen (s. 1.3.) in der Regel mechanisch kaum belastet. Bei zu intensivem Pumpen kommt es verschiedentlich zu Überdehnungen der Chromosomen. Die Überdehnung der Riesenchromosomen ist unter den genannten Isolierungsbedingungen nicht reversibel. In Gegenwart zu hoher, strukturverhärtender Magnesiumkonzentrationen (3-5 mM) kann es auch zur Fragmentierung der Riesenchromosomen kommen. Die freien Chromosomen verkleben im IS-Medium nicht und können bei einem geringen Verlust, der 10 % nicht überschreitet, in DESICOTE-silikonisierten, zugespitzten Mikropipetten von 5 - 10 µl (DRUMMOND - U.S.A.) ohne Hilfe eines Mikromanipulators aufgesogen und beliebig transferiert werden. Erst in dem Augenblick ihrer Übertragung in ein anderes, detergensfreies Medium beginnen die Riesenchromosomen unmittelbar zu haften. Einmal festgeklebt, sind sie in der Regel ohne Strukturschädigung nicht mehr abzulösen. Innerhalb von 1-10 Minuten nach ihrer Freisetzung werden die Riesenchromosomen aus dem IS-Medium entfernt. Bei längerem Verweilen leidet das Erscheinungs-

bild der Chromosomen. Gleichzeitig wird die Spreitbarkeit durch Verhärtung der Chromosomen gemindert. Innerhalb von 30 - 60 Minuten können 100 einzelne Riesenchromosomen I, II, III oder IV (aus verschiedenen Präparationsgefäßen) gesammelt werden.

1.3. Das Verhalten nativer Riesenchromosomen *in vitro*

Die isolierten, nicht gequetschten Riesenchromosomen messen in der Länge: Chromosom I, II: ~ 180 µm; III: ~ 140 µm; IV: ~ 70 µm. Die Chromosomen II und III von *Chironomus tentans* zeigen wie *in situ* je einen Nukleolus und das Chromosom IV seine 3 charakteristischen Balbianiringe von 15 - 18 µm Durchmesser (Abb. 5 c/d). Eine Rückbildung der Balbianiringe war im Standard-IS-Medium nicht zu beobachten. Es fällt auf, daß im Standard-IS-Medium isolierte Riesenchromosomen im Vergleich mit dem *in vivo*-Bild ein wenig verkürzt sind. Entsprechend sind die Quer- und Zwischenbanden optisch schärfer gegeneinander abgesetzt. Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, daß mit Ausnahme der Balbianiringe alle *in situ* als "Puffs" identifizierten Chromosomenorte in isolierten Riesenchromosomen zurückgebildet erscheinen. Dies gilt auch für bei pH 6.0 - 6.8 (in 0,1 mM PIPES) isolierte Riesenchromosomen, obwohl unter diesen Bedingungen das Bandenmuster und die Chromosomendimensionen noch am ehesten den Verhältnissen *in situ* entsprechen (vgl. dazu Abb. 6).

Die Nukleolen der nativ isolierten Riesenchromosomen sind morphologisch mit denen im Leben vergleichbar. Fixiert man isolierte Riesenchromosomen mit Äthanol-Eisessig (3:1), so breiten sich unmittelbar nach Zugabe des Fixierungsmittels die Nukleolen um fast das Doppelte ihrer Größe (von ca. 30 µm auf 55 µm) aus. Dieser Effekt ist vor allem durch die Essigsäure bedingt. Werden freie Riesenchromosomen lediglich mit 45 % Essigsäure behandelt, so führt das fast immer zur Auflösung der Nukleolensubstanz, während das Querscheibenmuster, wahrscheinlich ebenfalls durch in Lösung gehende Proteine und RNA bzw. RNP schärfer konturiert hervortritt. Andere Fixierungsmittel wie Glutaraldehyd (GA, 2 - 6,5 %) oder Formaldehyd (2 - 10 %) haben diese Wirkungen nicht. Bei höheren pH Werten (> 7,8), bei Inkubation mit destilliertem Wasser oder in einer Salzlösung von 340 - 400 mM KCl (oder NaCl), ändert sich die Struktur der isolierten Riesenchromosomen, in Analogie zu dem Verhalten in ganzen, isolierten Kernen, dramatisch. Zuerst bilden sich Puff-ähnliche Anschwellungen aus, welche stärker kondensiert bleibende Chromosomenregionen in der Querschnittsbreite überragen (s. Abb. 7 b). Bei weiterer Verquellung "verschwimmt" die Querscheibengliederung der Chromosomen, sodaß neben einigen wenigen Banden nur α-Heterochromatin-Blöckchen (am linken Telomer in Abb. 7 c) und die 3 Balbianiringe von Chironomus tentans deutlich sichtbar bleiben (Abb. 7c und 7 d). In keinem Fall kommt es bei diesen durch Ionen bewirkten Konformationsänderungen zu einer vollständigen Dekondensation der Banden.

Der Ablauf der Konformationsänderungen in vitro ist für das Chromosom I von Chironomus tentans in Abb. 8 dargestellt. Die Länge wurde jeweils dreimal und die Querschnittsbreite an drei verschiedenen Abschnitten ebenfalls dreimal gemessen: am fächer-förmig gespreizten, rechten Arm

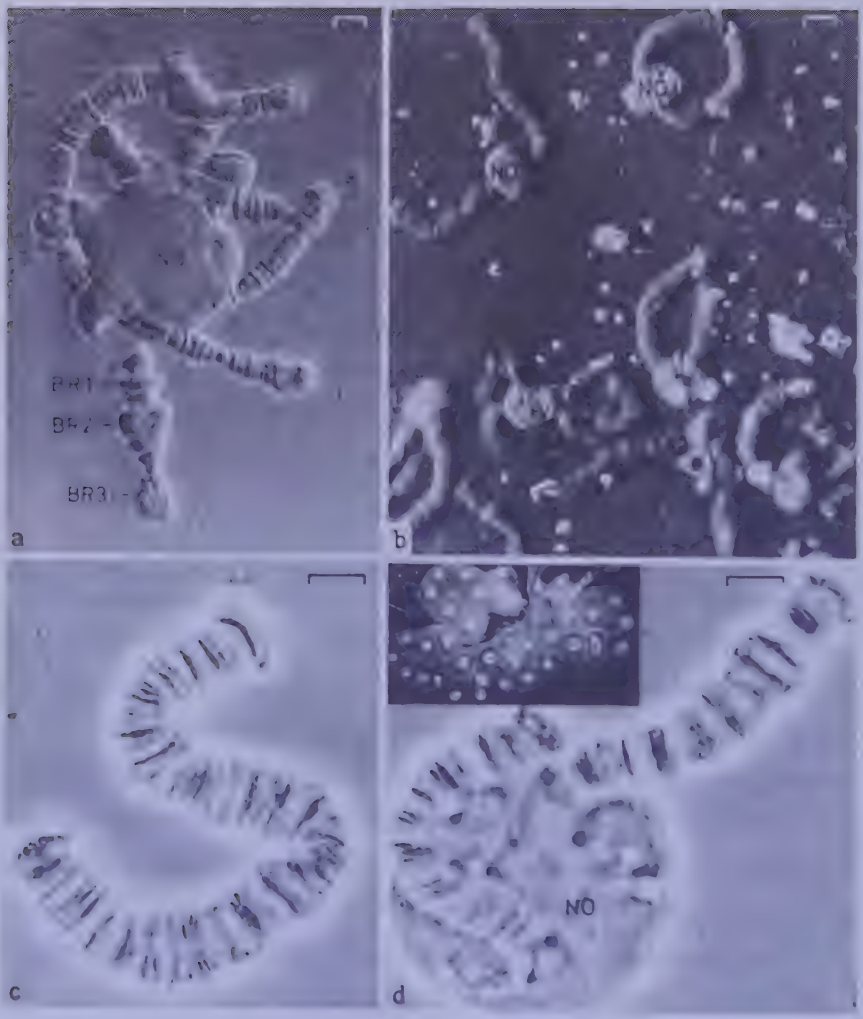


Abb. 5:

a) Nativ isolierte, kontrastierte Riesenchromosomen von Chironomus tentans im Dunkelfeld (HOMARSKI-Aufnahme). Das kleinste Chromosom (IV) des Genoms zeigt die 3 charakteristischen Balbianringe. Die Banden aller Chromosomen I-IV sind als Erhebungen, die Zwischenbanden als Ver-

tiefungen anschaulich. Die beiden Nukleolen (NO) liegen sehr eng beieinander im Kernzentrum.

b) Native Chromosomen unmittelbar nach ihrer Freisetzung, wie man sie in der Regel im Isolationsmedium vorfindet (Med. I, s. Tab. 1).

c und d) Nativ isolierte Chromosomen im Phasenkontrast-Bild, nicht gefärbt. Abgesehen von der, hauptsächlich vom gewählten pH 6.0 abhängigen, stärkeren Kondensation, stimmt das morphologische Erscheinungsbild der IS-Chromosomen mit demjenigen in der Speicheldrüse vorhandenen, gut überein. Das Inset in (d) zeigt zum Vergleich die Dunkelfeld-Aufnahme einer frisch explantierten, unfixierten Speicheldrüse von Chironomus tentans. Maßstab 10 µm.

(Abschn. 16 A), am dickeren, linken Arm (Abschn. 2 A) und in der Chromosomenmitte (Abschn. 9 A). Nach Tabelle 2 mißt das Chromosom I in einem Inkubationsmedium, wie es ähnlich auch für die Funktionsprüfung der Riesenchromosomen im zellfreien System verwendet wurde (115 mM NaCl, 1,0 mM $MgCl_2$, 10 mM TRIS-HCl, pH 7.3, ansonsten s. Tab. 7 - 10) in der Länge 135 µm, sein Durchmesser beträgt am rechten Arm 13 µm und im Abschnitt 9 A 10 µm. Ersetzt man diese Salzlösung durch ein Medium, das neben 115 mM NaCl, 10 oder 15 mM $MgCl_2$ enthält, bewirkt das eine deutliche Überkondensation im Querschnitt wie in der Chromosomenlänge (Abb. 8 a/b und Tab. 2). Das Ausmaß der Kontraktion ist zudem ionenspezifisch. So ist bei Verwendung einer äquimolaren Menge Mangan an Stelle von 10 oder 15 mM Mg^{++}, unter sonst gleichbleibenden Bedingungen, der Kondensationsgrad immer geringer. In diesem Fall ähnelt das Erscheinungsbild eher dem in (8a) als in (8b) abgebildeten Zustand. Nach Entfernen der 10 oder 15 mM Mg^{++}- bzw. Mn^{++}-haltigen Salzlösung wurde das Chromosom bei einem konstanten Mg^{++}-Anteil von 1,0 mM nacheinander mit ständig höheren NaCl-Konzentrationen (-380 mM) überschichtet (Abb. 8 c - e). Dies bewirkt eine Expansion besonders im Querschnitt der Chromosomen

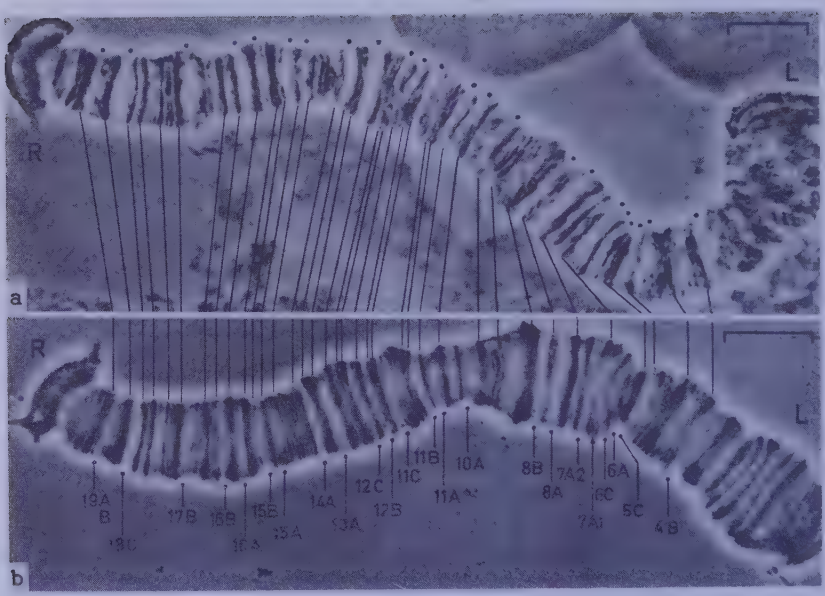


Abb. 6:

a) In der Speicheldrüse fixiertes Chromosom I von Chironomus tentans. Verschiedene Puffs sind mit Punkten (.) gekennzeichnet. Karmin-Essigsäure-Färbung. Phasenkontrast. Quetschpräparat. Maßstab 10 µm.

b) Aus der Schwesterdrüse in Med. III (s. Tab. 1) nativ isoliertes Chromosom I. Die in vivo (a) sichtbaren Puffs sind in isolierten Chromosomen nicht sichtbar (vgl. die bezifferten Regionen in a und b). Verbindungslinien sollen die Orientierung in beiden Chromosomen erleichtern. Maßstab 10 µm. Phasenkontrast. Nicht fixiert.

und ist mit einer Kontrastminderung der Quer- und Zwischenbanden gekoppelt. Im vorliegenden Fall (von 8a - e) nahm die Chromosomenlänge um ca. 40 µm (= 30%) und der Chromosomendurchmesser um das Zweieinhalbfache

Abb. 7:
Morphologische Gliederung nativ isolierter Chromosomen I (a-c), IV (d) von Chironomus tentans in
a 115 mM KCl/NaCl; 0,5 mM $MgCl_2$; 0,5 mM $CaCl_2$; 0,1 mM PIPES pH 6.0
b 50 -70 mM NaCl ; 0,5 mM $MgCl_2$; 0,5 mM $CaCl_2$; 10 mM TRIS-HCl pH 7.3
c-d 340-360 mM NaCl ; 0,5 mM $MgCl_2$; 0,5 mM $CaCl_2$; 10 mM TRIS-HCl pH 7.3

Niedriges und hohes Salz führen gleichermaßen zur Dekondensation der in mittlerem Salz bei pH 6.0 kondensierten Chromosomen.Kontrastärmere,stärker verquellende Chromosomenabschnitte wechseln mit kontrastreichen, dichteren Regionen (•).Balbianiringe (BR) sind gleichfalls kontrastreich (vgl.auch Abb.18).Danebenliegend ist ein verquollener Kern sichtbar.Nicht fixiert.Phasenkontrast. Maßstab 10 µm.

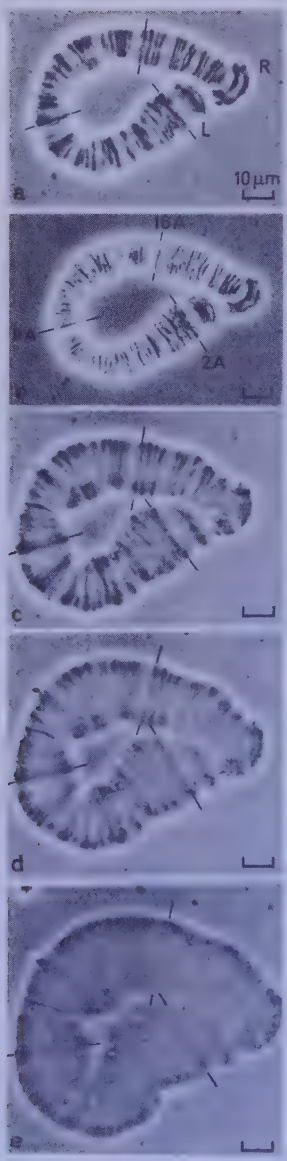


Abb. 8:

Konformationsänderungen eines nativ isolierten Chromosom I von Chironomus tentans in:

a) 10mM TRIS-HCl, pH 7.3, 115mM NaCl, 1.0mM $MgCl_2$
b) 10mM TRIS-HCl, pH 7.3, 115mM NaCl, 15.0mM $MgCl_2$
c) 10mM TRIS-HCl, pH 7.3, 340mM NaCl, 1.0mM $MgCl_2$
d) 10mM TRIS-HCl, pH 7.3, 360mM NaCl, 1.0mM $MgCl_2$
e) 10mM TRIS-HCl, pH 7.3, 380mM NaCl, 1.0mM $MgCl_2$

Erläuterungen im Text. Phasenkontrast. Nicht fixiert. Maßstab 10 µm.

zu. Dennoch (in 8 e) bleibt das charakteristische Querscheibenmuster des Chromosom I erhalten. Auch die äußeren Konturen (in 8 a - e) stimmen ziemlich gut überein. Die Verquellung der Chromosomen bei steigender KCl- oder NaCl-Konzentration ist intensiver, wenn die Inkubation mit 10 bzw. 15 mM Mg^{++} unterbleibt (vgl. Abb. 7c und 8e).

Abnorme Verquellungen bis auf das Drei- und Vierfache des normalen Chromosomendurchmessers (ca. 10 µm) ergeben im übrigen auch: Heparin (0,6%) Glycerin (10 - 15 % bei pH 5 - 6); das ionische Detergens Sarkosyl (0,5 %); Saccharose (0,3 M); hohe Salzkonzentration von 0,6 M NaCl und darüber sowie Aqua dest. Alle aufgequollenen Riesenchromosomen reagieren sehr empfindlich auf Konzentrationsänderungen im Inkubationsmedium durch Verdunstung. Eine Fixierung der Riesenchromosomen

Variabilität der Chromosomenlänge

Abb.:

a)	1. Messung:	83 mm = 133 µm	Gilt als Bezugsobjekt, da der in vivo-Konformation morphologisch am ähnlichsten (= 100 %)
	2. Messung:	86 mm = 137 µm	
	3. Messung:	84 mm = 134 µm	
	Mittel-W. :	84 mm = 135 um	
b)	1. Messung:	80 mm = 128 µm	Ab- bzw. Zunahme gegenüber a:
	2. Messung:	77 mm = 123 µm	- 10 µm (= - 7 %)
	3. Messung:	78 mm = 125 µm	
	Mittel-W. :	78 mm = 125 um	
c)	1. Messung:	92 mm = 147 µm	
	2. Messung:	90 mm = 144 µm	+ 12 µm (= + 9 %)
	3. Messung:	93 mm = 149 µm	
	Mittel-W. :	92 mm = 147 um	
d)	1. Messung:	98 mm = 157 µm	
	2. Messung:	98 mm = 157 µm	+ 21 µm (= + 15 %)
	3. Messung:	96 mm = 153 µm	
	Mittel-W. :	97 mm = 156 um	
e)	1. Messung:	104 mm = 166 µm	
	2. Messung:	102 mm = 163 µm	+ 31 µm (= + 23 %)
	3. Messung:	105 mm = 168 µm	
	Mittel-W. :	104 mm = 166 µm	

Variabilität des Chromosomendurchmessers

Abb.	rechter Arm	linker Arm	Centromer
a)	10 µm =100%	13 µm =100%	10 µm =100%
b)	wegen der starken Halo-Erscheinung keine genaue Messung möglich		
c)	17 µm + 7 (= 67%)	19 µm + 6 (= 50%)	17 µm + 6 (= 58%)
d)	20 µm + 10 (= 95%)	23 µm + 10 (= 76%)	19 µm + 9 (= 82%)
e)	22 µm + 12 (=122%)	26 µm + 13 (=104%)	23 µm + 13 (=123%)

Tab. 2:
Vergleich der in Abb.(8 a-e) sichtbaren, salzabhängigen Größenunterschiede des Chromosom I von Chironomus tentans in vitro.

in diesem aufgequollenen Zustand mit Äthanol-Eisessig (3:1) ist unmöglich und führt zur Zerstörung der Chromosomen-Struktur. Versuche, in hohem Salz, d.h. 600 - 900 mM NaCl befindliche Riesenchromosomen in physiologischen Salzlösungen von 130 - 150 mM NaCl bei einem abgestuften pH von 7.3 - 6.0 zu rekondensieren, mißlingen fast immer. Von vornherein mit geringeren NaCl-Konzentrationen (70 bzw. 340 mM NaCl) dekondensierte Chromosomen lassen sich eher ohne sichtbare Strukturschädigung rekondensieren.

2. Elektronenoptische Analyse

2.1. Allgemeine EM-Morphologie der Riesenchromosomen in Ultradünnschnitten

Schon bei der ersten, flüchtigen Betrachtung eines Ultradünnschnitt-Präparates wird deutlich, daß das elektronenoptische Erscheinungsbild der Riesenchromosomen mit dem lichtoptischen grundsätzlich übereinstimmt, das heißt lichtoptisch dichte Banden sind auch elektronenoptisch dicht, s. auch Beermann und Bahr (1954). Verschiedene Banden durchsetzen die Chromosomen im Querschnitt als durchgehende, schwarze Linien. Andere Banden erscheinen des öfteren in ihrem Verlauf unterbrochen. Wieder andere Banden sind granulärer Natur (Abb. 9), s. Referate in Beermann (1962; 1972). Alle Querscheiben sind so dicht, daß ihre Innenstruktur unauflösbar bleibt. In ihrer Dicke variieren die Querbanden von Chironomus tentans zwischen 0.09 - 0.6 µm. Die dickeren Banden (i. e. 0.4 - 0.6 µm) könnten zum Teil Doppelbanden darstellen,

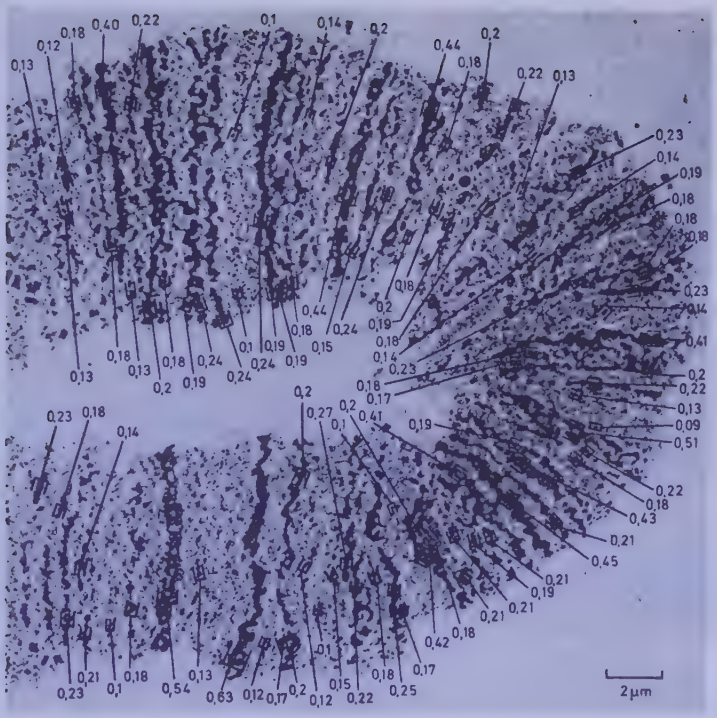


Abb. 9:

Elektronenoptisches Erscheinungsbild eines in der Speicheldrüse fixierten Chromosom III von Chironomus tentans (Hedy) im 400 - 800 A dicken Ultradünnschnitt. Die Schichtdicken (=Banden) sind beziffert. x 5.600

BANDEN (im Ultradünnschnitt Abb. 9)

µm	gemessene Anzahl			
0.09	(1)	=	6	
0.1	(5)			
0.12	(3)			
0.13	(6)			
0.14	(5)	=	19	
0,15	(2)			
0.17	(3)			
0.18	(15)	=	15	
0.19	(7)			
0.2	(8)			
0.21	(5)	=	30	
0.22	(7)			
0.23	(3)			
0.24	(4)			
0.25	(1)	=	6	
0.27	(1)			
0.41	(2)			Doppelbanden
0.42	(2)			"
0.43	(1)	=	8	"
0.44	(2)			"
0.45	(1)			"
0.51	(1)			Komplex
0.54	(1)	=	3	"
0.63	(1)			"
			87	

INTERBANDEN (in mehreren Schnitten)

µm	gemessene Anzahl
0.06 - 0.09	(9)
0.11 - 0.16	(15)
0.17 - 0.2	(7)
0.2 - 0.3	(4)
	35

EINZEL-CHROMATIDEN (in mehreren Schnitten)

80 - 130 Å (37)

Tab. 3:

Größenbestimmung der Quer- und Zwischenbanden, sowie Einzel-Chromatiden, in vivo fixierter, ultradünn geschnittener Riesenchromosomen

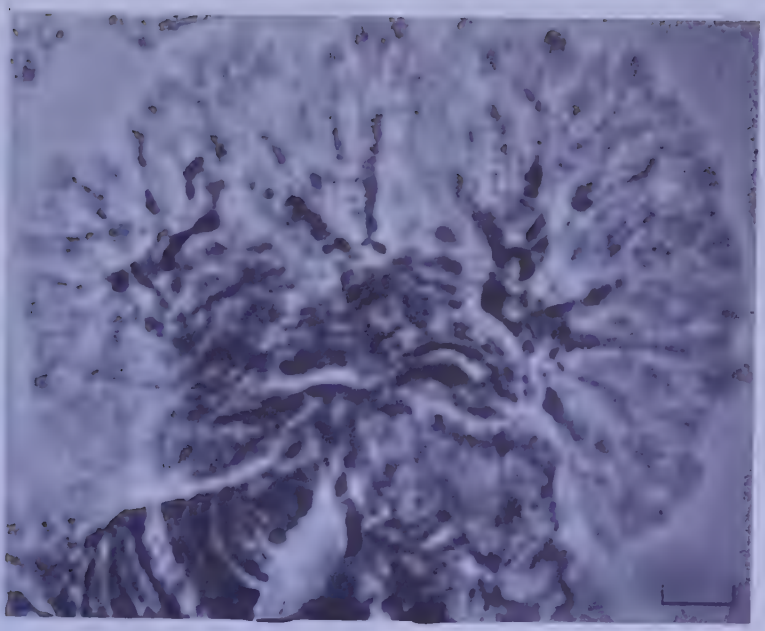


Abb. 10:

Chironomus tentans - Balbianiring 2 im Chromosom IV der Speicheldrüse. Fächerförmig ausstrahlende, oligotäne BR-Teilstränge. Den eigentlichen Puff des BR 2 stellen die peripheren, bauschigen Knäuel dar. Karmin-Orcein-Essigsäure-Färbung. Phasenkontrast. Maßstab 5 µm.

wie es sich in dem Auftreten von Spalträumen andeutet. Wie aus Abb. (9) und Tab. (3) hervorgeht, kommen 0.1 - 0.25 µm dicke Querbanden bei Chironomus tentans am häufigsten vor und unter diesen wiederum am häufigsten solche von 0.18 - 0.22 µm Dicke. Dabei bleiben submikroskopische Banden unberücksichtigt.

Die Dicke der Zwischenbanden, gemessen an den oligotänen Balbianiring-Teilsträngen, variieren von 0.06 - 0.3 µm. Am häufigsten werden Abstände von 0.06 - 0.13 µm gemessen. Werte von 0.2 - 0.3 µm und darüber kommen vor allem bei stark gequetschten Chromosomenpräparaten vor und sind wahrscheinlich auf die Überdehnung der Chromosomen zurückzuführen.

2.2. Feinbau der Chromomeren

2.2.1. Die Struktur der oligotänen Balbianiring-Teilstränge

Wie in früheren Arbeiten im Detail bereits untersucht (Bauer und Beermann, 1952; Beermann 1952, 1962, 1972), spaltet sich in den 3 Balbianiringen des Chromosom IV von Chironomus tentans der polytäne Kabelverband fächerförmig in Oligotänfibrillen auf. Die gröberen Teilstränge (von 2 - 3 µm Breite) teilen sich zur Peripherie hin mehr und mehr in feinere Teilstränge von 0,5 µm bis hinunter zu 0,1 µm. Jeder Teilstrang endet an der Peripherie in einem bauschigen Knäuel, das lichtoptisch nicht weiter aufzulösen ist (Abb. 10). Oligotäne Balbianiring-Teilstränge der Länge nach getroffen, lassen den Feinbau der Chromosomen besonders gut erkennen. Die erhaltenen Schnittbilder (11b, 12, 13) sind als Negative dargestellt. Dieses Verfahren erlaubt es, den Fibrillärbau in Ultradünn-

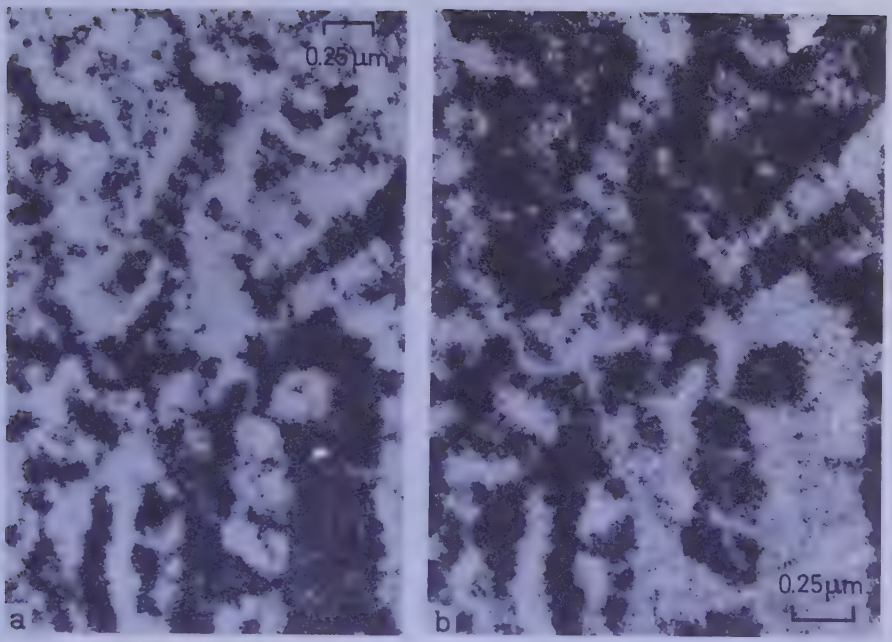


Abb. 11:

Elektronenoptisches Schnittbild verschiedener Banden und oligotäner Teilstränge von Chironomus tentans in (a) Positiv- und (b) Negativdarstellung. Abb. (c) zeigt den Teilabschnitt eines nativ isolierten Chromosoms in räumlicher Darstellung. An Stelle der in (b) sichtbaren Fibrillärstruktur im Bandeninnern, ist hier das rasterelektronenoptisch erstellte Oberflächenprofil eines gestreckten Chromosoms, mit aperiodisch wechselnden Banden unterschiedlicher Dicke und Abstandsweite, zu erkennen. Längsgerichtete, oligotäne Teilstränge sind in den Zwischenbanden als "glatte Kabel" augenfällig. Schätzungsweise 100 Elementarfibrillen bilden einen oligotänen Teilstrang. In den Bandenregionen treten zusätzlich globuläre Verdickungen (= Chromomerenaggregate) hervor, die den oligotänen Teilsträngen perlschnurartig aufsitzen.

a: x 40 000; b: x 48 000; c: 10 000

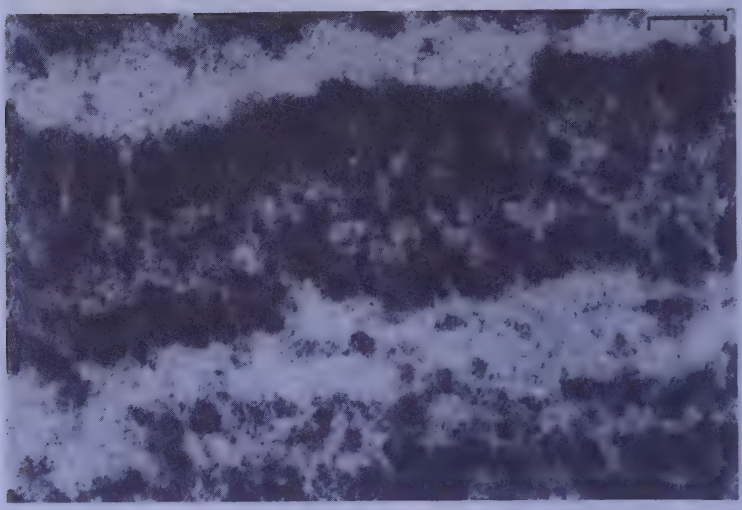
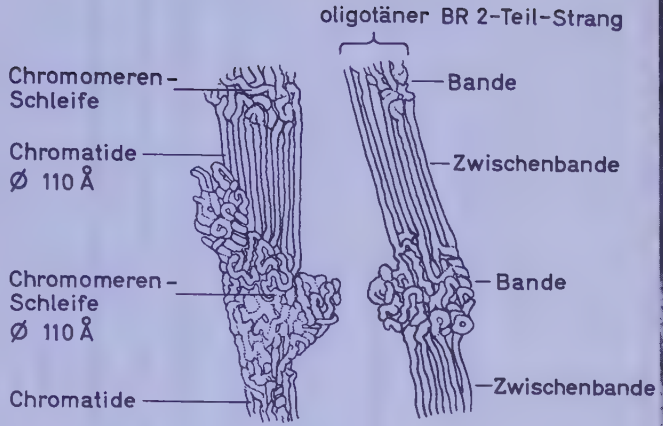


Abb. 12:

Elektronenoptisches Schnittbild, das den fibrillären Bau der Quer- und Zwischenbanden veranschaulicht.
x 60 000. Maßstab 0.25 µm. Negativdarstellung.

schnitten besser zu demonstrieren.

Alle Querbanden sind aus eng gepackten, stark gefalteten und gewundenen Fibrillen aufgebaut. Diese elementaren Fibrillen messen 80 - 130, im Mittel 110 A, vgl. Abb. (11 a und 11 b). Ein geometrisches Muster z.B. in Form mehr oder weniger enger Spiralen, wie in den Spreitungsbildern (Abb. 16 a - c), ist nicht zu erkennen. Direkt an der Schnittfläche gelagerte Fibrillen erscheinen "heller" als tieferliegende. Sie messen 100 - 110 A im Durchmesser. Dies gilt auch für die Fibrillen in den Zwischen-



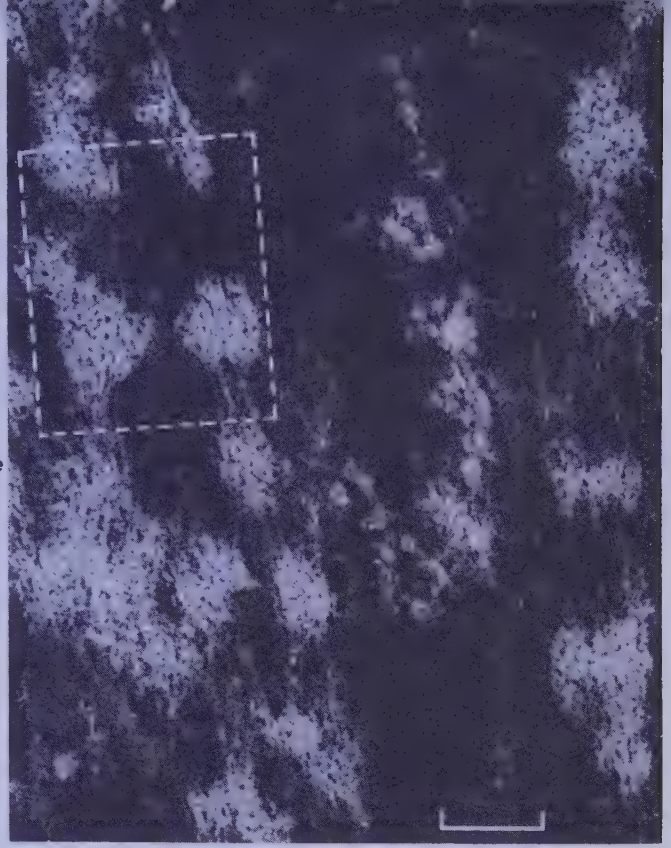


Abb. 13:
Ausschnitt und Ausschnitts-Zeichnung eines elektronenoptischen Schnittbildes oligotäner Teilstränge unmittelbar unterhalb des Balbianiring 2-Puffs.
x 80 000. Maßstab 0.25 µm. Negativdarstellung.

banden. Der Übergang von der Zwischenbanden-Region in die Querbanden-Region, ist auch bei sehr dünnen Querbanden durch den abrupten Übergang der gestreckten in eine geknäuelte Konformation der Fibrillen gekennzeichnet, vgl. Abb. (12). Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 13) lassen die oligotänen BR-Teilstränge in der Schnittebene etwa 5-8 Einzel-Chromatiden erkennen. Jede der Chromatiden verläuft in den etwas überdehnten Zwischenbanden, die hier von 0.05 - 0.3 µm variieren, mehr oder weniger geradlinig. Benachbarte Chromatiden berühren sich in den Zwischenbanden nicht. In der Übergangszone von den Zwischenbanden in die Banden biegen die Chromatiden plötzlich um und sind auf verhältnismäßig engem Raum knäuelartig gepackt. Eine bevorzugte Orientierung ist nicht zu erkennen. Die intermittierend angeordneten Knäuel stellen Chromomeren dar. In manchen Ultradünnschnitt-Präparaten können einzelne Chromatiden über eine Länge von 0.1 µm verfolgt werden, die dann, unverändert im Durchmesser und wieder verhältnismäßig geradlinig orientiert, die angrenzenden Zwischenbanden durchziehen.

2.3. Untersuchungen an Spreitungs-Präparaten

2.3.1. Der Fibrillenbau der oligotänen Balbianiring-Teilstränge

Die Spreitung nativer Riesenchromosomen ist schwierig, in erster Linie wegen der polytänen Kabelstruktur. Alle Versuche, Kerne mit Chromosomen geringerem Polytäniegrades aus dem 1. oder 2. Larvenstadium zu spreiten, scheiterten an der Stabilität der Kernmembran. Eine Chromosomen-Isolierung

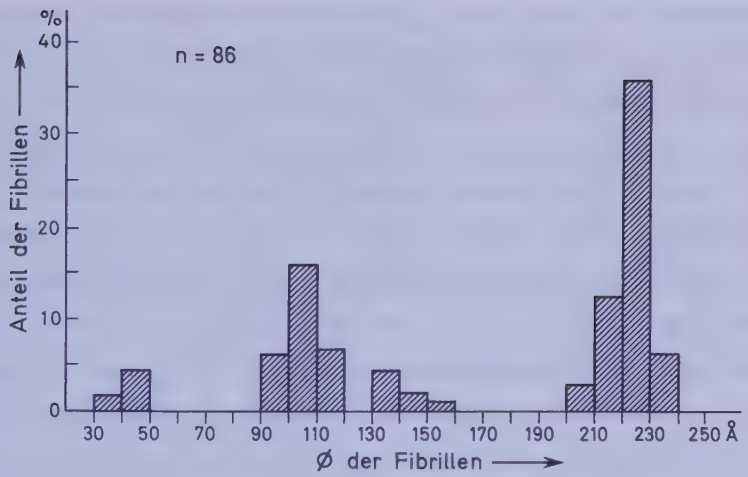


Abb. 14:

Größenverteilung einzelner Fibrillen gespreiteter Polytänchromosomen von Chironomus tentans. Spreitungsmedium war: Aqua bidest, pH 7 - 8.5, eingestellt mit 0.01 M BO_3-Puffer, pH 9.22.

in diesen frühen Larvenstadien kommt ebenfalls nicht in Betracht.

An einer WASSER-LUFT-INTERPHASE gespreitete Riesenchromosomen werden gewöhnlich stark gestreckt, d.h. die Quer- und Zwischenbanden werden auseinander gezogen, sodaß das Bandenmuster klarer als im Lichtmikroskop zu erkennen ist. Die Aufteilung in lateraler Richtung ist aber ungenügend. Derartige EM-Präparate sind auch für Beschleunigungsspannungen von 100000 Volt zu dicht (s. Abb. 15 a).

Im Bereich der oligotänen Teilstränge der Balbianiringe gelingt es eher, einzelne Elementarfibrillen darzustellen. Ein Ausschnitt ist in Abb. (15b) sichtbar. Gruppen von parallel orientierten Fibrillen überschneiden sich mit anderen. Es kommen zwei Klassen von Fibrillen vor: Wurden in Ultra-

dünnschnitten nur Dicken von 60 - 130 A gemessen, wobei die 110 A-Fibrille dominiert, so erscheinen in den auf Aqua dest. (pH 7-8.5) gespreiteten Präparaten hauptsächlich 200 - 230 A Fibrillen. Daneben aber auch sehr dünne von 30 - 50 A (Abb. 14, 15b). Manche Fibrillen können über eine Strekke von 3-5 µm verfolgt werden. Messungen einzelner, gespreiteter Fibrillen über längere Abschnitte zeigen Übergänge von 110 auf 230 A. Im Gegensatz zu den Fibrillen in ultradünnen Schnitten, zeigen die gespreiteten Fibrillen häufig ein perlschnurartiges Aussehen, auch dann, wenn die Riesenchromosomen in nicht Metall-bindenden GOOD-Puffern (s.1.1.) isoliert werden. Man hat den Eindruck, daß der Perlschnur-Aspekt durch Herauslösen von Proteinen zustandekommt. Wird Chromatin im Moment des Spreitens von der wässerigen Hypophase abgenommen und sofort fixiert (s.u.), so ist die durch Nukleosomen geprägte Perlenstruktur (im PWS-Negativkontrast) gut zu erkennen. Der Durchmesser auf den Fibrillen verbleibender "beads" beträgt 110 - 200 A. Dies ist am besten bei oberflächengespreiteten Riesenchromosomen zu sehen. In diesem Fall kommen Nukleosomen in enger und weiter Distanz voneinander vor. Größere Abstände sind vermutlich Spreitungsartefakte und gehen auf eine leichte Streckung der Fibrillen während der Spreitung zurück (Abb. 15b - Inset). Bei längerem Verbleiben (3 - 10 Min.) der "beaded - fibers" auf der wässerigen Hypophase geht der Perlschnur-Aspekt verloren.

2.3.2. Die Struktur der Einzel-Chromatiden

Taucht man Netze mit gespreiteten Fibrillen für 10 Minuten bis zur Hälfte in eine Trypsinlösung (1 mg/ml - 15 Min.), so erscheinen nach der Fixa-

tion (in 10% Formalin; 0.1M Saccharose, pH 8.5) und der Kontrastierung mit 2% Uranylacetat die dem Enzym ausgesetzten Fibrillenabschnitte als durchgehende Linien von ca. 30 A Durchmesser, während unbehandelte Fi - brillen bis zu 230 A messen. Der Übergang zwischen dünnen und dicken Fi- brillenabschnitten ist abrupt. Solche, bei der Trypsinbehandlung ent - standenen, 30 - 50 A Fibrillen wurden nachfolgend einer Desoxyribonukle- ase-Behandlung (1mg/ml für 1-5 Min.) unterzogen. Obwohl versucht wurde, die Versuchsbedingungen genau einzuhalten, d.h. die Netzchen ebenfalls nur bis zur Hälfte in die DNase-Lösung einzutauchen, so ist dennoch nicht auszuschließen, daß das Enzym im Grenzbereich auch auf einige, nicht mit Trypsin vorverdaute Fibrillen einwirken könnte. Möglicherwei- se deuten dies einige der Lücken der 230 A-Fibrille an. Trotzdem führt das Verfahren zu recht eindeutigen Aussagen. Die ursprünglich bis 300 A dicken, durchgehenden Fibrillen werden durch die DNase in fragmentierte, unterschiedlich lange DNA-Fibrillen von ca. 30 A Dicke zerlegt (Abb.15c). Diese Befunde bestätigen, daß die morphologische Kontinuität der Fibril - len auf DNase-sensitivem Material (DNA) beruht. Gleichzeitig wird mit der allein zurückbleibenden ca. 30 A-Fibrille anschaulich, daß jeweils nur ein DNA-Molekül das " Rückgrat " jeder Chromatide darstellt, also letztere uninemen Charakter hat. Eine Behandlung mit in Wasser gelöster Ribonukle - ase (1mg/ml für 5-10 Min.) hat keine mit der Pronase-DNase-Behandlung vergleichbare Veränderung der Fibrillenmorphologie zur Folge. Allerdings erscheinen die RNase-behandelten Fibrillen verschiedentlich kontrastär- mer(nicht gezeigt). Eine Verringerung des Fibrillendurchmessers auf 30 - 40 A bzw. die Fragmentierung der Fibrillen wurde hingegen niemals beob - achtet.

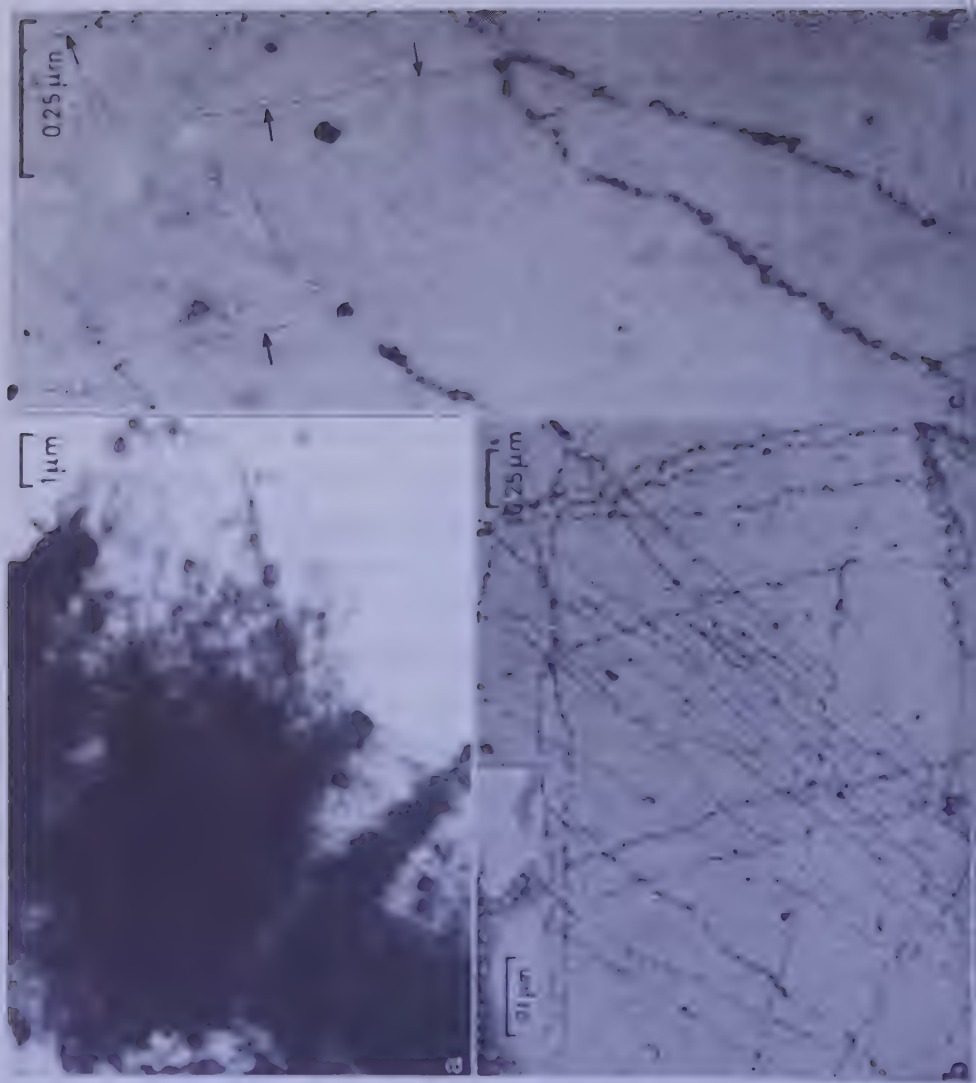

0.25 µm
1µm
0.25µm
0.25µm

Abb. 15:
a) An einer Wasser-Luft-Interphase gespreiteter Teilbereich eines nativ isolierten, hochpolytänen Chromosom I von Chironomus tentans. Bandenregionen sind auch bei Beschleunigungsspannungen von 100 000 Volt elektronendicht. x 10 000

b) Perlschnurartig aussehende Chromatiden unmittelbar nach Auflösung eines oligotänen Teilstranges mittels Spreitung. Im Gegensatz zur 110- 130 A-Fibrille in Dünnschnitten, variiert der Durchmesser gespreiteter Chromatiden von 30-300 A. x 44 000
Inset: Nukleosomenketten bei höherer Vergrößerungsstufe. x 150 000

c) Enzymatischer Abbau gespreiteter Fibrillen durch Eintauchen einer Netzfläche zuerst in ein Trypsin-, dann DNase-haltiges Medium. Den Enzymen ausgesetzte, dadurch dünnere und fragmentierte Fibrillen-Abschnitte besitzen ca. 30 A Durchmesser(↑), während unbehandelte Fibrillen meistens 200-250 A messen. x 124 000

2.3. Die Struktur der Chromomeren

Wie erwähnt, lassen sich an einer Wasser-Luft-Interphase die Riesenchromosomen in elementare Fibrillen aufspalten. Nachteilig bei der Oberflächen-Spreitung ist jedoch die übermäßige Streckung der Fibrillen. Werden demgegenüber aufgequollene Riesenchromosomen mittels Mikro-Zentrifugation auf die Netze aufgebracht, so werden die Einzel-Chromatiden viel schonender voneinander getrennt.
Auch in diesen Präparaten verlaufen die Einzel-Chromatiden in den Zwischenbanden verhältnismäßig parallel. In den vermutlichen Banden werden neben den gestreckten Fibrillen nun aber andere sichtbar, die mehr oder weniger verdrillte Schleifen bilden(vgl.Abb. 16a und b). Solche Schleifen scheinen den gestreckten (Zwischenbanden-) Fibrillen in der Bandenregion seitlich aufzusitzen. Die Abstände der Schleifen variieren zwischen 0.6 - 3.0 µm. Es ist nicht auszuschließen, daß die weiteren Abstände erst dadurch entstehen, indem Schleifen von den Fibrillen abreißen oder vollständig entfaltet werden. Manche Bilder kann man so deuten, daß die Zwischenban-

den-Fibrille im Insertionspunkt der Schleife in diese einmündet und auf der gegenüberliegenden Seite wieder in die Zwischenbanden-Fibrille ausmündet (Abb. 17 a). Der Durchmesser der Fibrillen in den Schleifen beträgt 100 - 110 A. Die Zwischenbanden-Fibrillen messen in der Regel gleichfalls 100 - 110 A (in 10 mM PO_4-Puffer, pH 7.0). Die Schleifenfibrillen scheinen oft besser erhalten als die Zwischenbanden-Fibrillen. Neben sehr eng gefalteten und gewundenen Schleifen findet man auch solche, die in Form einer (8) aufgedreht erscheinen, vgl. Abb. (17 b/c). Die Konturlänge der bei einem vollständigen Umgang, d.h. vom oberen zum unteren Kontaktpunkt jeweils gebildeten DNP-Schleife mißt in dem in Abb. (17 b) dargestellten Fall 600 A. Vorausgesetzt 3000 Basenpaare ergeben 1 µm DNA und der Verkürzungsfaktor letzterer beträgt in den DNP-Schleifen 3:1 (s. Diskussion), dann entsprechen 1600 A ca. 1400 Basenpaare. Das heißt, alle 1400 Basenpaare kommt es in diesem speziellen Fall zu einer neuen Windung. Bei enger gestellten Windungen kann die Zahl bis auf ca. 1000 Basenpaare abnehmen. Die von den Fibrillen gebildeten Schlaufen messen 200 - 250 A in der Breite und 300 - 500 A in der Länge. Schlaufen unter 200 A Durchmesser wurden in keinem Spreitungspräparat gemessen. Hingegen ist die Breite der Schlaufen nach oben hin variabel, da sie davon abhängig ist, in welchem Ausmaß die Chromatiden-Schleifen gelockert bzw. despiralisiert sind. Daß Schleifen, wie die in Abb. (17) gezeigte und gezeichnete durch die Spreitung gerade ausgerichtet sind, ist verhältnismäßig selten. Meistens bilden sie eng verschlungene, verdrehte Konfigurationen. Andererseits wird bei starker Spreitung beobachtet, daß gefaltete Schleifen aufreißen und untereinander verbundene Ringe entstehen. Auch können sich solitäre Ringe von 0.2 - 2.0 µm Konturlänge bilden.

Nur wenige Chromatiden-Schleifen bleiben während der Spreitung im aufge-

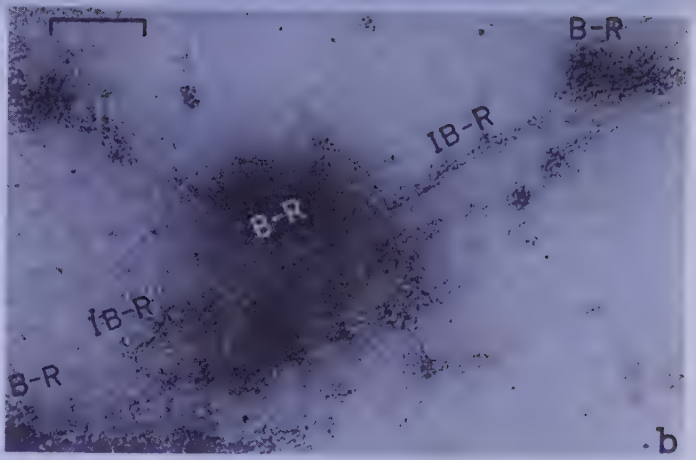
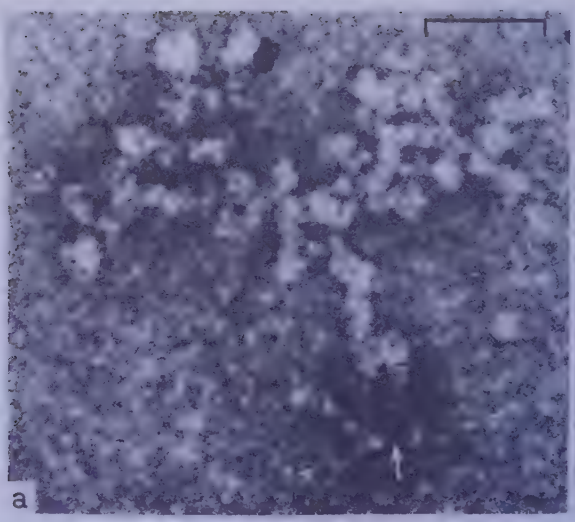


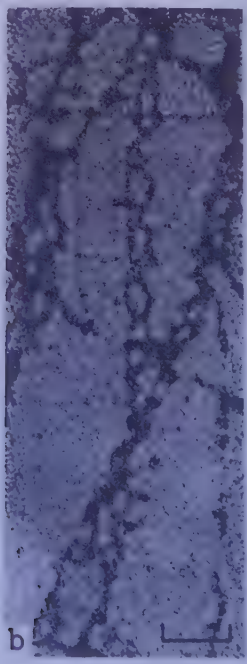
Abb. 16:

a) Chromomeren-Schleifen unterschiedlichen Entfaltungs- und strukturellen Erhaltungsgrades in Banden eines oligotänen Teilstranges. Solche Schleifen fehlen den Zwischenbanden. x 62000

b) Schwach gespreiteter, oligotäner Teilstrang mit Banden (B-R) und Zwischenbanden-Regionen (IB-R). In den Zwischenbanden ziemlich parallel verlaufende Einzel-Chromatiden sind in den Banden geknäuelt angeordnet.
x 36000. Maßstab 0.5 µm.


a

c


b

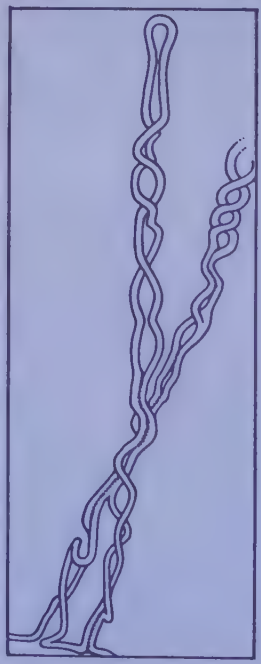


Abb. 17:

In Bandenregionen gespreiteter, oligotäner Teilstränge vorhandene Chromatiden-Schleifen (=Chromomeren) unterschiedlichen Spiralisationsgrades:

a) Stark gefaltetes Chromomer. Zwischen den beiden vermutlichen Insertionsstellen ist eine Lücke (↑) sichtbar. x 230 000

b) In Bandenregionen häufig zu beobachtende Konfiguration der Einzel-Chromatide, sich in Form einer (8) aufzuwinden. x 125 000

c) Übergangsform zwischen sehr eng spiralisierten Chromomeren und vollkommen entspiralisierten Schleifen. Chromomeren werden in den Einzel-Chromosomen in etwa gleicher Position gebildet (↑). Nur das Chromomer der mittleren Fibrille ist in diesem speziellen Fall (c) strukturell erhalten. Die beiden anderen Chromomeren sind abgerissen, was auf ihre Empfindlichkeit gegenüber mechanischen Einflüssen hindeuten könnte. x 105 000. Maßstab 0.1 µm.

denen Zustand erhalten. Liegen die Zwischenbanden-Fibrillen nach schwacher Spreitung noch verhältnismäßig parallel angeordnet, dann zeigt sich, daß die Seitenfibrillen, also Schleifen, ungefähr in gleicher Höhe von der Zwischenbanden-Fibrille wegführen, bzw. ihr aufsitzen. Im Gegensatz zu den Schleifen selber, die offensichtlich mechanisch leicht zu schädigen sind und abreißen, scheinen ihre vermutlichen Insertionsstellen erhalten zu bleiben (Abb. 17 c). Abbauversuche mit proteolytischen Enzymen und DNase (je 1 mg/ml für 5 - 10 Min.) ergaben (nicht gezeigt), daß die Schleifen und Zwischenbanden-Fibrillen (wie in Abb. 15c) fragmentiert werden. Ribonuklease ergibt keinen derartigen Effekt. Dieser Befund spricht dagegen, daß es sich bei den Schleifen um Transkripte handelt. Die Chromatiden - Schleifen stellen deshalb vermutlich die Elementar-Chromomeren dar, s. Diskussion und Abb. (18). In dem Durcheinander der ausgebreiteten und sich überlagernden Einzel - Chromatiden, vielen Chromomeren-Fibrillen in ihrem Verlauf zu folgen, ist schwierig. Die Längen der Schleifen betragen zwischen 0.8 - 8.4 µm (Tab. 4). Es ist nicht auszuschließen, daß noch längere Schleifen vorhanden sind und

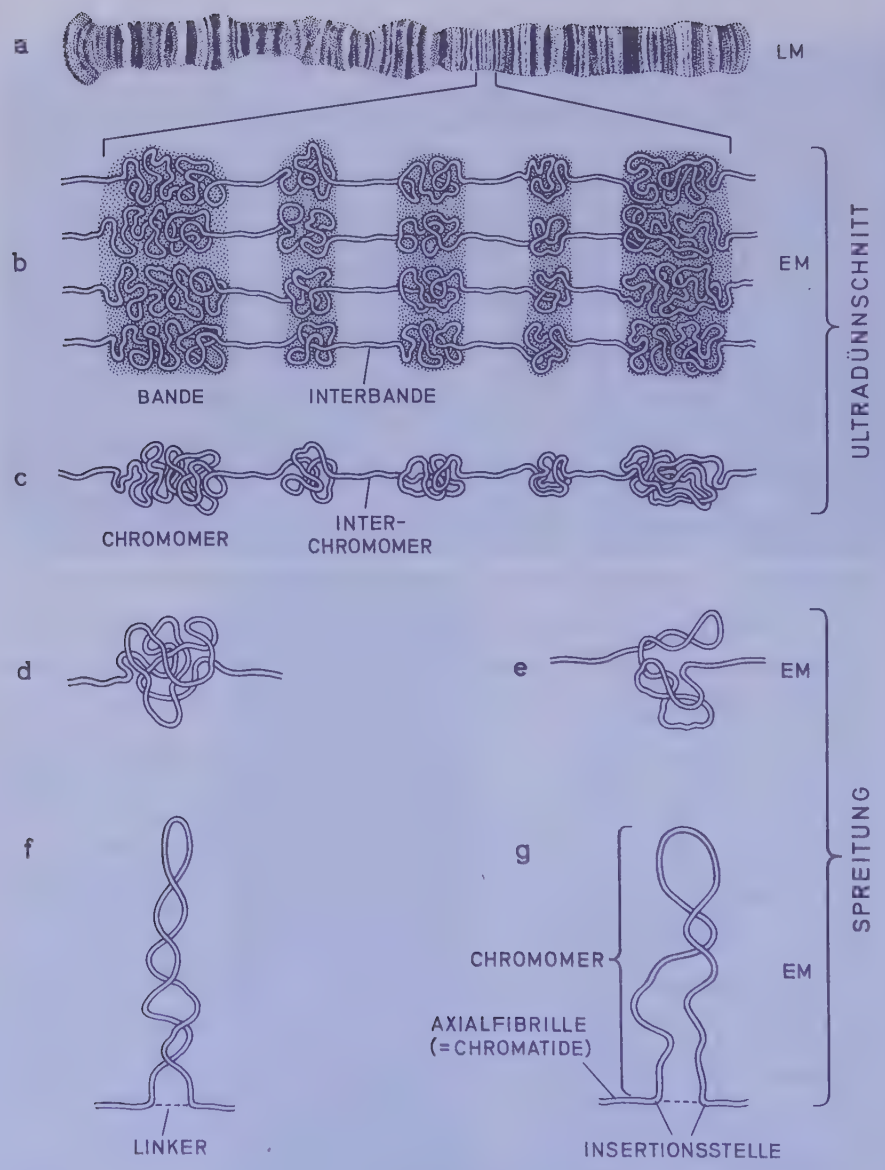


Abb. 18:
Anhand von Ultradünnschnitt- und Spreitungs-Präparaten schematisierte Darstellung des Fibrillärbaues polytäner Chromosomen.
b) Riesenchromosomen im Lichtmikroskop. b) Oligotäner Teilstrang mit Banden und Interbanden im Elektronenmikroskop. c) Einzel-Chromosom (=Chromatide, Elementarfibrille) mit Chromomeren und Interchromomeren. d-g) Durch Spreitung dekondensierte und despiralisierte Chromomeren. Weiter Erläuterungen im Text.

n	Schleifen-längen (µm)	DNA - Länge	Basenpaare (KB)
21	0.8 - 1.5	2.4 - 4.5	7.2 - 13.5
17	1.7 - 2.5	5.1 - 8.1	15.3 - 14.3
14	4.1 - 5.6	12.3 - 16.8	36.9 - 50.4
6	6.2 - 8.4	18.6 - 25.2	55.8 - 75.6

Tab. 4:

In Bandenregionen nativ isolierter, gespreiteter Riesenchromosomen von Chironomus tentans vorhandene Chromatiden-Schleifen (=CHROMOMEREN). Rechnet man mit einem Verkürzungsfaktor 3:1 (s.Diskussion), so lassen sich für die DNP-Schleifen DNA-Längen von ca. 2 - 25 µm bzw. 7 - 75 Kilo-Basen (KB) ermitteln.

nicht erfaßt wurden. v-bodies (Olins und Olins, 1973) bzw. Nukleosomen (Oudet et al. 1975) wurden auf den Schleifen nicht beobachtet.

2.4. Die Struktur des Balbianiring 2-Puffs

Die Spreitung von Balbianiringen setzt die Isolation nativer Riesenchromosomen voraus. Vor der Verwendung von isolierten Chromosomen IV für die Spreitung mußte geklärt werden, ob und wieweit die BR 2-Situation noch mit den Verhältnissen in situ, also in der Speicheldrüse, übereinstimmt. Der Feinbau des BR 2 in isolierten Chromosomen IV gleicht im Schnittbild dem Feinbau in situ (Beermann und Bahr, 1954; Stevens und Swift, 1966; Yamamoto, 1972).

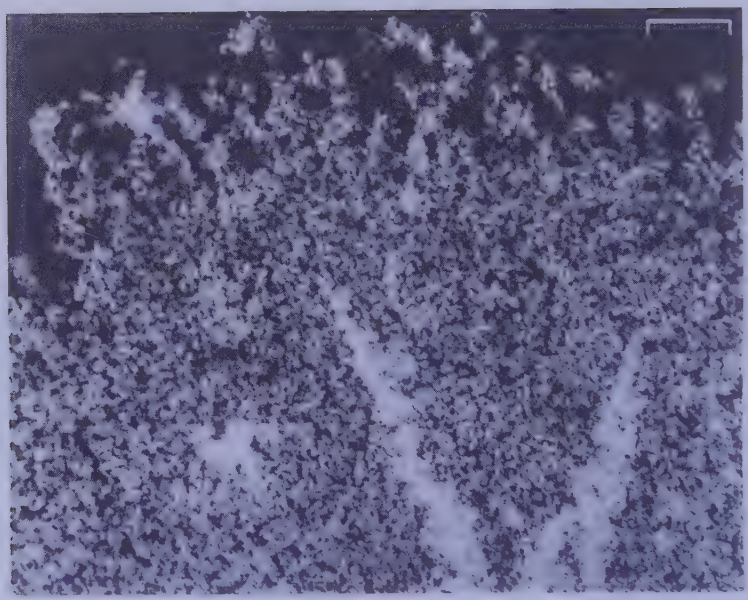


Abb. 19:

Teilbereich des Balbianiring 2-Puffs im Ultradünnschnitt-Präparat eines im Standard-IS-Medium nativ isolierten, in vitro mit Glutaraldehyd fixierten Chromosom IV von Chironomus tentans. Die in Abb. (10) lichtoptisch sichtbaren, bauschigen Knäuel besitzen zahlreiche, lokusspezifische Ribonukleoprotein-Grana von 300 - 500 A Durchmesser.
x 32 000, Maßstab 0,5 µm.

Vorherrschendes Element der diffusen Randzone des BR 2, die den eigentlichen Puff darstellt, sind im elektronenoptischen Schnittbild die zahlreichen Ribonukleoprotein-Grana von 300 - 500 A Durchmesser. Im Schnittbild sind die BR-Grana auf einem nicht genau zu erkennenden Achsenfaden wechselständig angeordnet und erscheinen gestielt. Der in Abb. (23a) ge-

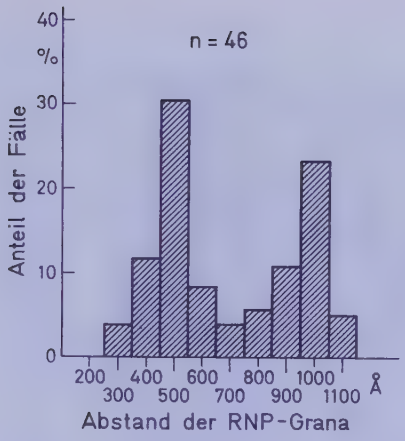


Abb. 20:

Analysiert wurde die Abstandsweite gespreiteter BR 2-RNP-Grana entweder durch Messen der Entfernung von einem Grana-Centrum zum Centrum der jeweils benachbarten BR 2-Grana oder die Grana-Anzahl pro µm bestimmt.

zeigte, ca. 2 µm lange Teilabschnitt trägt z.B. - soweit man erkennen kann - 25 - 30, zwischen 300 und 500 A messende Ribonukleoprotein-Grana (BR-Grana), die durch 150 A dicke, 500 - 870 A lange Stiele mit dem nicht erkennbaren DNA-Achsenfaden verbunden sind. Bestimmt man anhand von Schnittbildern die Anzahl der Grana pro Flächeneinheit und bezieht diesen Wert auf den durchschnittlich 25 µm breiten Balbianiring 2, so ergibt das für die hier verwendeten Chromosomen des Larvenstadiums 4 mit Polytäniegrad von etwa 4000, insgesamt 0.8 - 1.2 x 10^6 RNP-Grana.

Die Spreitung von Chromosomen IV durch Mikro-Zentrifugation in bidestilliertem Wasser bei pH 7 - 8.5 ergibt (Abb. 21a, b, c; 23b) im BR-Bereich

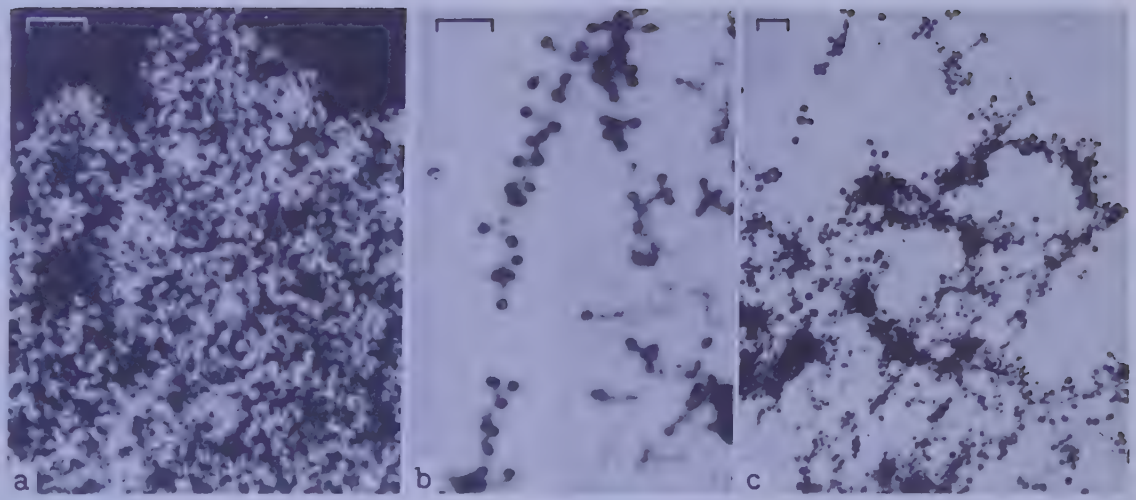


Abb. 21:

a) Ultrastruktur des schwach gespreiteten BR 2-Puffs eines nativ isolierten Chromosom IV von Chironomus tentans. Zahlreiche, eng gepackte und soweit sichtbar gestielte RNP-Grana sind vorhanden. x 55 000, Mikro-Zentrifugation (MZ)

b) Teilabschnitt einer transkribierten, gespreiteten BR 2-Schleife mit ca. 20, 300 A messenden RNP-Grana pro µm.
x 55 000, MZ

c) Elektronenoptisches Bild eines an einer Wasser-Luft-Interphase gespreiteten BR 2-Abschnittes. Unterschiedlich große RNP-Grana (300 - 500 A) kommen vor.
x 30 000, Maßstab 0.2 µm.

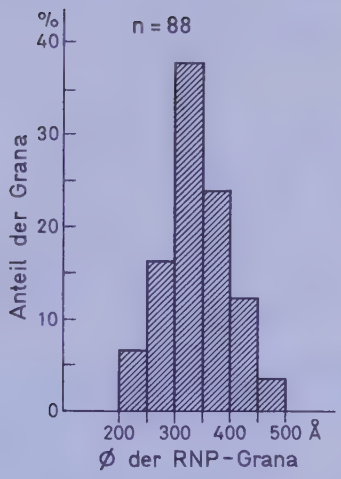


Abb. 22:

Größenverteilung der RNP-Grana durch Mikro-Zentrifugation oder an einer Wasser-Luft-Interphase gespreiteter Balbianiringe 2 nativ isolierter Polytänchromosomen von Chironomus tentans in Aqua bidest, pH 7.0 - 8.5.

ebenfalls globuläre Partikel von 300 - 500 A Durchmesser, die über größere Längen hinweg einem Achsenfaden aufsitzen. Der Achsenfaden hat einen Durchmesser von 110 - 140 A. Augenfällig ist die einheitliche Gestalt und Dichte der gespreiteten BR 2-Grana. Der Abstand zwischen den Grana beträgt in den durch Mikro-Zentrifugation gespreiteten Präparaten (von Centrum zu Centrum gemessen) im Mittel etwa 500 A. Danach würde die einzelne BR-Schleife mit ca. 20 Ribonukleoprotein-Grana pro µm besetzt sein

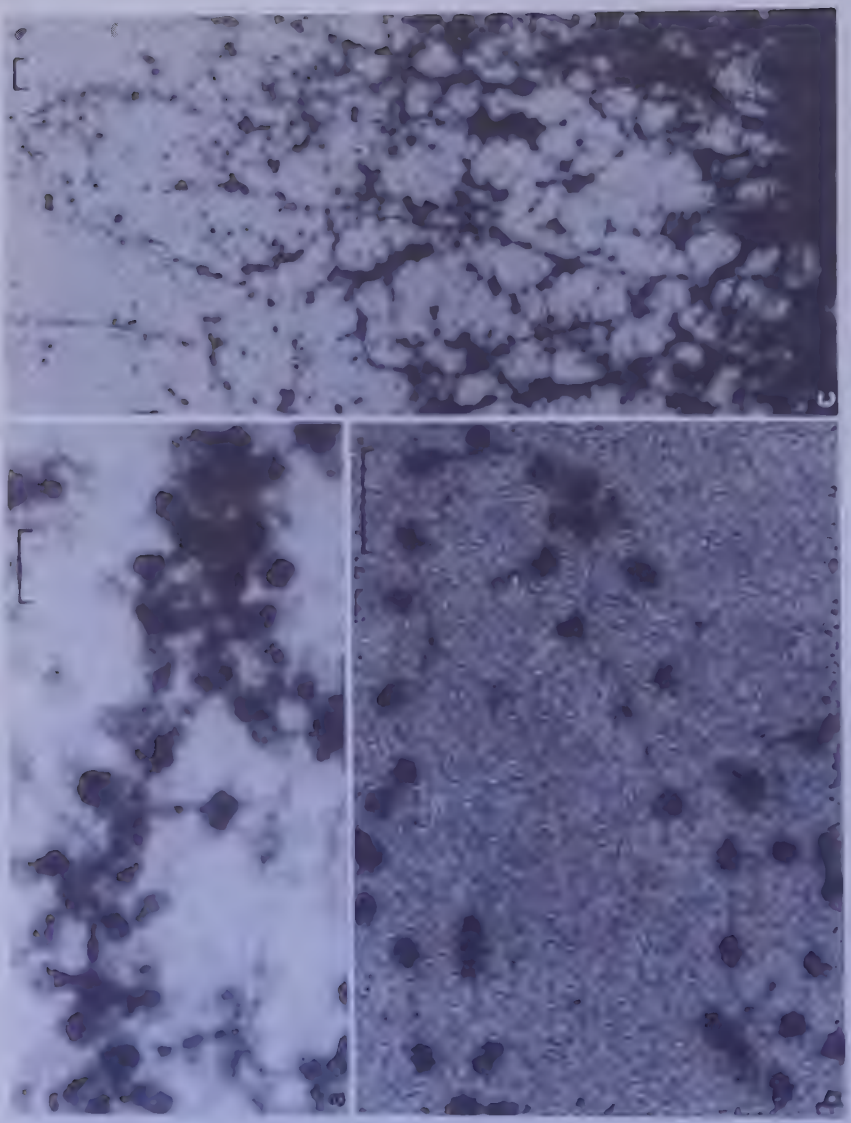

C
B
A

Abb. 23:

a) Scheitelpunkt einer transkribierten, in situ ultradünn geschnittenen Balbianiring 2-Schleife. Der ca. 2 um lange Teilabschnitt trägt -soweit man sehen kann- etwa 25 - 30, 300 - 500 A messende Ribonukleoprotein - Grana, die durch 150 A dicke, 500 - 870 A lange Stiele mit dem nicht deutlich sichtbaren DNP-Achsenfaden (=template) verbunden sind. x 141 000

b) Teilabschnitt eines durch Grenzflächenspannung gespreiteten BR 2. Die Abstände der RNP-Grana variieren von 300 - 1000 A. Der DNP-Achsenfaden mißt 40 - 80 A. Der Erhaltungszustand ist schlechter, als bei den durch Mikro-Zentrifugation gespreiteten Balbianiringen, vgl. Abb. (21 b). x 200 000

c) RNase-Einwirkung (1 mg/ml - 15 Min.) beseitigt die meisten gespreiteten Ribonukleoprotein-Grana des BR 2. x 60 000, Maßstab 0,1 µm.

(s. auch Abb. 21 b). Im einzelnen variiert der Abstand zwischen benachbarten RNP-Grana von ca. 300 - 1000 A (vgl. Abb. 20).

Anders als in ultradünnen Schnitten liegen die Stiele der gespreiteten BR 2-Grana im Spreitungspräparat dem DNP-Achsenfaden meistens eng an. Soweit erkennbar, sind die Stiele 130 A dick und 600 - 1000 A lang. Die Innenstruktur der BR 2-Grana läßt sich im Spreitungspräparat nicht weiter auflösen. Auch die Oberflächen-Spreitung in bidestilliertem Wasser, als optimalem Spreitungsmedium, führt nicht zur Ausfaltung der BR 2-Ribonukleoproteine. Mit diesem Spreitungsverfahren ist der strukturelle Erhaltungszustand der BR 2-Schleifen im ganzen weniger gut. Die DNP-Achsenfäden sind in oberflächengespreiteten Präparaten häufig dünner (i.e. 40-80 A), als in den durch Mikro-Zentrifugation gewonnenen Spreitungspräparaten. Auch variieren die Abstände der Grana noch stärker. Intervalle von 300-1500 A kommen vor; am häufigsten sitzen aber auch hier die BR 2-Grana 300 -500A auseinander. Auffälligerweise sitzen in den mittels Grenzflächenspannung gespreiteten Balbianiringen die Grana der Schleifenachse weniger deutlich gestielt auf. Wenn erkennbar, haben die Stiele eine Dicke von 80-130A

und 700 - 1500 A Länge. Die BR 2-Grana sind 250 - 300 A dick, also ebenso wie die DNP-Achse, etwas dünner als in den durch Mikro-Zentrifugation gespreiteten Balbianiringen. In Spreitungspräparaten können auch größere Schleifenstrecken von 0.12 - 0.36 µm Länge, völlig frei von RNP-Besatz, beobachtet werden. Im übrigen ist über längere Strecken hinweg in den BR 2-Schleifen kein Gradient in der Partikelgröße festzustellen, vgl. Abb. (17b). Bei der Betrachtung größerer, gespreiteter Balbianiringabschnitte mit entsprechend niedriger Vergrößerungsstufe ist ebenfalls keine gesetzmäßige Anordnung erkennbar. Es lassen sich aber Unterschiede in der Partikelgröße erkennen. Der Partikel-Durchmesser schwankt zwischen 250-500 A (s. Abb. 22 und Abb. 21c). Zur Länge der Transkriptionseinheiten s. Diskussion.

Die Behandlung der Spreitungspräparate mit 1mg/ml in Wasser gelöster Ribonuklease für 15 Minuten führt zum völligen Verschwinden der BR 2-Grana. Lediglich fibrilläres Material und einige Partikelfragmente bleiben erhalten (Abb. 23c). Diese Befunde bestätigen, daß RNase-sensitives Material (RNA) das "Rückgrat" der BR 2-Grana darstellt (vgl. auch Stevens und Swift, 1966)

3. Funktion der verschiedenen Struktur-Elemente der Chromosomen in vitro

3.1. RNA-Synthese isolierter Kerne

Die Inkubation der polytänen Kerne erfolgt bei 25°C und damit im physiologischen Temperaturbereich. An Stelle des für die Isolation verwendeten

Phosphat-Puffers (25 mM) dienten TRIS-HCl oder HEPES (10 oder 20 mM), eingestellt auf pH 7.3, als Puffersubstanzen. Die NaCl-Konzentration der in vitro-Systeme sind von 30 - 400 mM in vier Konzentrationsbereichen abgestuft. Radioaktiv markiertes Uridin-Triphosphat (3H-UTP, spez. Akt. 17 und 49 Ci/mMol) wurde von den Kernen a) 3-5 bzw. b) 30 Minuten lang eingebaut. Anschließend wurde ein Teil (a) der Kerne autoradiographiert, bei anderen (b) die Radioaktivität im Szintillationszähler direkt gemessen. Die Zusammensetzung der verwendeten Inkubations-Medien (INK-M.) sowie die Ergebnisse sind in Abb. (24, 25), Tab. (5) und Abb. (26) dargestellt.

Die in Riesenchromosomen am häufigsten vorhandene RNA-Polymerase ist das Enzym B (II) (Plagens et al., 1976). Gemessen an der eingebauten Menge radioaktiven UTPs wird das Enzym bei NaCl-Konzentrationen von 30 - 180 mM in den Kernen nur in geringem Maße stimuliert (Abb. 24). Hingegen steigern NaCl-Konzentrationen ab 250 mM den 3H-UTP-Einbau mehr und mehr, wie es der lineare Anstieg der Kurve widerspiegelt. Es ergibt sich schließlich in Analogie zu den aus anderen Kernsystemen seitlangem bekannten Daten, Widnell und Tata, (1964); Pogo et al., (1966); Zylber und Penman, (1971), ein Salzoptimum bei ca. 400 mM NaCl. Die RNA-Synthese-Aktivität der Polymerasen B (II)/C(III) zeigt während der Pulszeit von 30 Minuten nur eine geringe Abnahme.

Nach Weinmann und Roeder (1974) können auf Grund der differentiellen Hemmbarkeit durch alpha-Amanitin die RNA-Polymerasen in Eukaryonten unterschieden werden. Wird die Polymerase B (II) durch Präinkubation der isolierten Kerne mit alpha-Amanitin im Überschuß (40 µg/ml) inhibiert, so ergibt sich ein anderes Kurvenbild. Wie in Abb. (25) illustriert, wird im Gegensatz zu der Polymerase B (II) das Nukleolus-spezifische

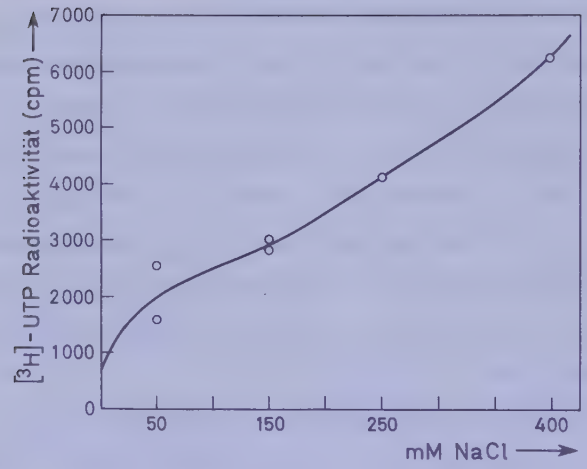


Abb. 24:

RNA-Synthese isolierter Speicheldrüsen-Kerne von Chironomus tentans im Konzentrationsbereich von 50-400 mM NaCl. Ein Ansatz enthält in einem Volumen von 200 ul 800-1000 polytäne Kerne. Das Reaktionsmedium bestand aus: 0.5 mM ATP, GTP, CTP; 2 µCi/ml 3H-UTP (spez. Aktivität 49 Ci/mMol); 0.1 mM Dithioerythreitol; TRIS-HCl 20 mM, pH 7.3; 2.0 mM $MnCl_2$ und den auf der Abzisse bezifferten NaCl-Konzentrationen. Die Inkubation wurde bei 25°C für 30 Minuten durchgeführt und nach Zugabe von 100 ug Hefe-RNA als Träger, durch weitere Addition von 5 ml eiskalter Trichloressigsäure (TCA) im Eisbad gestoppt. Die TCA-Lösung enthält 5 % Natriumpyrophosphat ($Na_2P_2O_2 \cdot 10\ H_2O$). Das Präzipitat wurde auf Glasfaserfiltern (Whatman GF/C) gesammelt, mehrmals mit 5 % TCA gewaschen, um das säurelösliche, radioaktive Material zu entfernen, getrocknet und in 0.5 ml Soluene (Packard Instrum.) aufgenommen. Nach 10 Minuten wurden 5 ml Toluol-Szintillator zugegeben und die Menge eingebauten 3H-UTPs bestimmt.

Enzym A (I) schon durch niedriges Salz (50 mM NaCl) zu hoher RNA-Synthese Aktivität angeregt. Bereits bei 100-150 mM NaCl wird das Salzoptimum erreicht. Höhere NaCl-Konzentrationen von 340-400 mM führen zu keiner weiteren Stimulierung der Polymerisations-Aktivität der Polymerase A (I), vgl. Fig. (25). Die rRNA-Syntheseleistung der Polymerase A (I) verringert

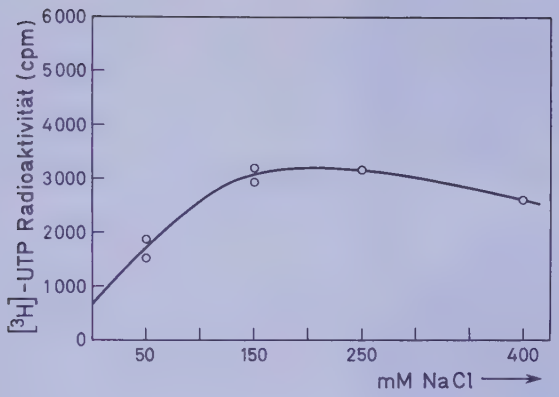


Abb. 25:

RNA-Synthese isolierter Speicheldrüsen-Kerne von Chironomus tentans unter Einfluß von α-Amanitin. Die Versuchsbedingungen gleichen den in der Legende zu Abb. (24) angegebenen. Vor dem 3H-UTP-Puls wurden die Kerne jedoch 10 Min. mit α-Amanitin im Überschuß (40 µg/ml) inkubiert und konnten dann in Gegenwart von α-Amanitin 3H-UTP (spez. Akt. 49 Ci/mMol) 30 Minuten einbauen.

sich in der zweiten Hälfte des Pulses von 30 Minuten.

In guter Übereinstimmung mit den Daten der direkt gemessenen Radioaktivität befinden sich die Befunde der autoradiographischen Analyse. Sie bestätigen, daß verschiedene NaCl (oder KCl)- Konzentrationen verschiedene Aktivitäten der endogenen RNA-Polymerasen bewirken. In niedrigem Salz, d.h. 30 - 70 mM NaCl, inkubierte Kerne lassen sich durch die intensive Nukleolen-Markierung vor allem die Stimulation der Polymerase A (I) erkennen. Im Vergleich dazu ist über den verquollenen Riesenchromosomen nur

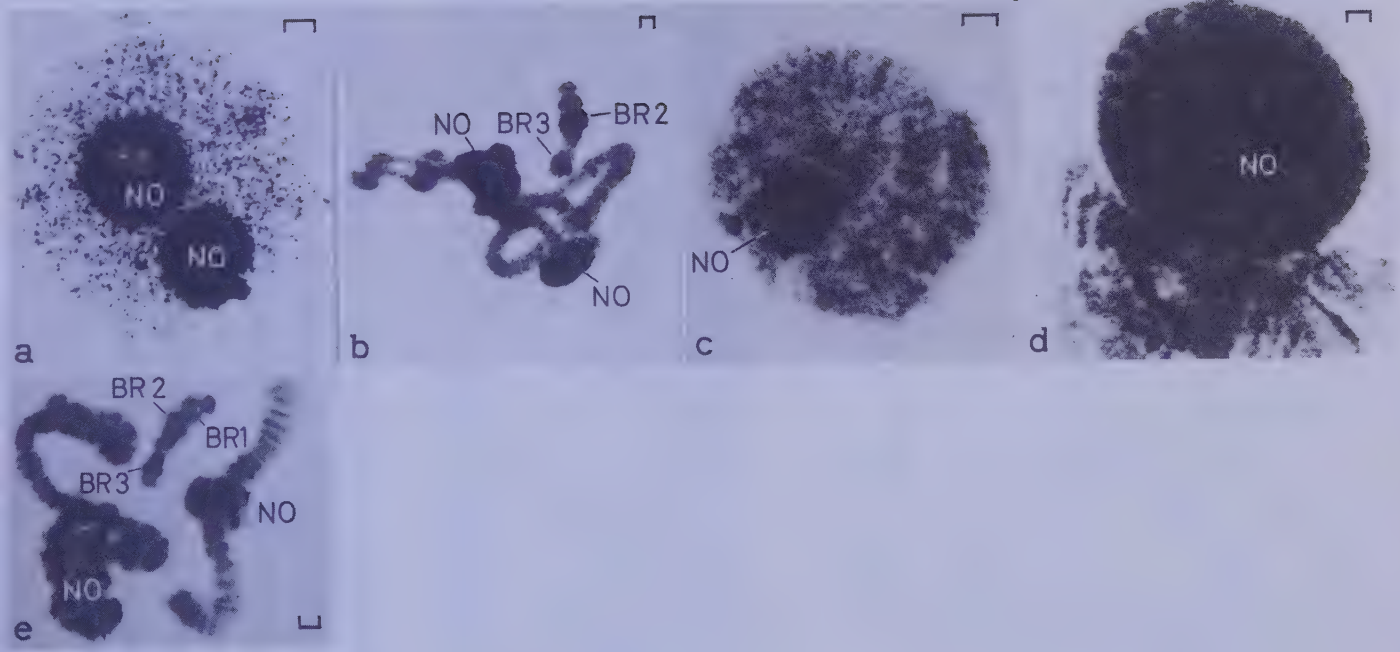


Abb. 26:

Autoradiographien des 3H-Uridintriphosphat-Einbaues isolierter Speicheldrüsen-Kerne für 3 - 5 Minuten bei 25 °C in: a) 30 - 70 mM; b) 140 - 180 mM; c) 200 - 250 mM; d) 340 - 400 mM NaCl. Die übrigen Ingredenzien sind in Tab. (5) ersichtlich. e) 10 Minuten vor dem 3H-UTP-Puls mit alpha-Amanitin im Überschuß (40 µg/ml) inkubierte Kerne zeigen nur Nukleolenmarkierung (-Kontrolle), weitere Erläuterungen im Text. Durchlicht, Hämalaun-Färbung. Maßstab 10 µm.

eine schwache Markierung festzustellen (Abb. 26 a). Diese schwache Markierung kann durch alpha-Amanitin unterdrückt werden (Abb. 26e). Es gibt also in niedrigem Salz eine mäßige Enzym B (II)/C(III)-Aktivität in den aufgequollenen Banden. 63 Kerne zeigten dieses autoradiographische Erscheinungsbild. 4 Kerne zeigten keinen Einbau der radioaktiven Vorstufe. 33 der ursprünglich 100 im Testansatz vorhandenen Kerne wurden bei der Präparation (Fixierung, Trocknung) zerstört. Dies deutet (wie auch im hohen Salz s.u.) auf eine erhöhte Verletzbarkeit gequollener Kerne hin.

Entsprechend der in Abb. (4) dargestellten Beziehung zwischen der Chromosomenstruktur und der Salzkonzentration bleibt bei 140 - 180 mM NaCl der typische chromosomale Kondensationszustand erhalten. In diesem Konzentrationsbereich ist die Nukleolenmarkierung vorherrschend. Zugleich fällt die intensive Schwärzung der Balbianiringe, vor allem des BR 2, ins Auge (Abb. 26b). Dagegen übertrifft die allgemeine Silberkorndichte über den Chromosomen die bei 30 - 70 mM NaCl nur wenig. 5 Kerne zeigten keinen Einbau des 3H-UTP. In Abb. (26c) ist das Ergebnis für die bei 200 - 250 mM NaCl inkubierten Kerne illustriert. Neben der Streu-Markierung über den ganzen Kernraum waren bei 76 Kernen Silberkornansammlungen über den Banden zu beobachten. Die Zuordnung der Markierung zu definierten Banden ist allerdings kaum möglich. Die stark 3H-UTP einbauenden Nukleolen sind leicht zu identifizieren. Die direkte Messung des 3H-UTP Einbaues im Szintillationszähler hat ergeben, daß dies nicht auf Stimulation der Polymerase A (I) beruht, s. Abb. (24) und (25).

Werden die Kerne in hohem Salz (350 - 400 mM NaCl) pulsmarkiert, so stimmen Größe und Struktur mit dem in niedrigem Salz (i.e. 30 mM NaCl) beobachteten Verhalten überein. Dagegen unterscheiden sie sich drastisch im Einbau. Die bei 400 mM NaCl markierten Kerne sind bei gleicher Pulsdau-

er (5 Min.) sowie gleicher Expositionszeit (10 Tage) regelmäßig völlig mit Silberkörnern zugedeckt. Erst eine Pulsverkürzung auf 3 Minuten läßt die bandenlokalisierte Markierung der Kerne sichtbar werden. Es ist von besonderem Interesse, daß bei dieser Salzkonzentration, im Gegensatz zu den bisherigen Erfahrungen dieser Funktions-Analyse mit geringeren Salzkonzentrationen, alle Kerne markiert sind. Anders als in niedrigem Salz, platzen schon während der Inkubation, also nicht nur bei der Fixierung und Trocknung, einige Kerne auf (s. Abb. 26d). Die herausquellenden Chromosomenabschnitte veranschaulichen die vermehrte Enzymleistung in den Banden besonders deutlich. Stets wechseln optisch dichte, stark markierte Banden, mit helleren Zonen. Im Kerninnern ist die Banden-lokalisierte Schwärzung so intensiv, daß die ebenfalls stark markierten Nukleolen kaum noch hervortreten.

Auf dem Niveau der nukleolären RNA-Synthese kommt es in den Autoradiographien auch dann zu keiner Änderung, wenn vor dem 3H-UTP-Puls die Kerne mit alpha-Amanitin im Überschuß (w.o. 40 µg/ml, 10 Minuten) behandelt werden. Die Autoradiographien von 119 Kernen (= 94,1 %) gleichen in ihrer Nukleolen-Markierung vollständig den mit alpha-Amanitin behandelten Kernen. Im Kontrast dazu besitzt die Masse der Amanitin-behandelten Kerne (= 83,2 %) keine Balbianiring- und Chromosomen-Markierung (s. Abb.26c und Tab. 6). 13 Kerne (= 10,9 %) ließen keine Wirkung des alpha-Amanitins erkennen und zeigten in der üblichen Weise markierte Balbianiringe, Nukleolen und Banden. 7 Kerne (= 5,8 %) waren überhaupt nicht markiert.

NaCl-(mM)	STRUKTURELL erhalten	STRUKTURELL nicht erhalten	markiert	nicht markiert	MARKIERUNGSINTENSITÄT NO	BR	Banden
30 - 70	67	33	63 (94,0 %)	4 (6,0 %)	+++	(+)	(+)
140 - 180	81	19	76 (93,8 %)	5 (6,2 %)	+++	++	+
200 - 250	78	22	76 (97,4 %)	2 (2,6 %)	+++	+++	++
340 - 400	57	43	57 (100 %)	- -	+++	+++	+++

Zusätzlich enthielten alle Medien:

Dithioerythreitol (DTT) : 0,1 mM
CTP, GTP, ATP : 0,2 mM
3H - UTP : 1 µCi/ml (spez.Akt. 24 Ci/mMol)
TRIS-HCl o. HEPES : 20 mM, pH 7.3
$MnCl_2$: 2 mM

Pulsdauer bei 25°C = 3-5 Minuten

NO = Nukleolen
BR = Balbianiringe

SIGNATUR:

(+) = sehr schwache Markierung
\+ = schwache Markierung
++ = starke Markierung
+++ = sehr starke Markierung

Tab. 5:

3H-Uridintriphosphat (UTP)-Einbau isolierter Speicheldrüsen-Kerne von Chironomus tentans. In den Autoradiographien (Expositionszeit 8 - 10 Tage) wurde die Strukturerhaltung, Markierung und Markierungsintensität ermittelt

NaCl – (mM)	STRUKTURELL erhalten	STRUKTURELL nicht erhalten	DAVON ZEIGEN Amanitin–Wirkung NO	BR	Banden	keine Amanitin–W. NO	BR	Banden	keine Markierung NO	BR	Banden
			i.e.+++ –		–	+++	+++	+ – ++	–	–	–
180 – 230	21	3	16	(76,2 %)		3	(14,3 %)		2	(9,5 %)	
	36	7	31	(86,1 %)		5	(13,9 %)		–	–	
	33	6	31	(93,9 %)		2	(6,1 %)		–	–	
	29	11	21	(72,4 %)		3	(10,3 %)		5	(17,3 %)	
SUMME:	119	27	99	(83,2 %)		13	(11,0 %)		7	(5,8 %)	

Präinkubation der Kerne:

40 µg/ml alpha–Amanitin
in 140 mM NaCl – 10 Min.

Vgl. ansonsten Tab. 5

Tab. 6:

3H–UTP–Einbau isolierter Kerne in Gegenwart von alpha–Amanitin

3.2. RNA-Synthese isolierter Riesenchromosomen

Autoradiographische Untersuchungen der RNA-Synthese isolierter Kerne erlauben die Zuordnung der Markierung zu einzelnen, definierten Chromosomenorten in der Regel nicht. Es wurden daher isolierte, native Riesenchromosomen in 3 abgestuften Konzentrationsbereichen (NaCl) mittels Autoradiographie auf ihre Templateaktivität geprüft.
Wie schon erwähnt (s. 1.1.; 1.3.; 3.2.), zeigen die Riesenchromosomen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Testmediums eine unterschiedliche Morphologie. Während man bei einer Salzkonzentration von 150 - 250 mM NaCl ein verhältnismäßig scharfes Bandenmuster findet, verquellen Riesenchromosomen in Anwesenheit von 340 - 400 mM NaCl mehr und mehr, sodaß sie bei 400 mM NaCl (oder KCl) schließlich ein Mehrfaches (ca. 30 - 40 µm) ihres natürlichen Durchmessers (8 - 10 µm) erreichen. Frühere autoradiographische Untersuchungen (Pelling, 1964) haben ergeben, daß das Chromosom I von Chironomus tentans im Mittel 45 Puffs aufweist. Demgegenüber zeigen isolierte, in vitro inkubierte Chromosomen I von verschiedenen Larven des Stadiums 4 in der vorliegenden Untersuchung 60 - 80 markierte Querbanden (vgl. Abb. 28a,c; 29a). Eine vollständige Schwärzung aller Querbanden, etwa vergleichbar der kontinuierlichen Markierung bei der DNA-Synthese in vivo, war in keinem einzigen Fall zu beobachten.

Bei näherer Betrachtung der Markierung erkennt man, daß die Masse der Silberkörner an anderen Stellen als in den "normalen" Autoradiographien in situ markierter Chromosomen lokalisiert ist. Überraschenderweise befinden sich gegenüber den typischen RNA-Markierungsbildern im Leben (z.B. in Abb. 30, Inset), wo die Silberkörner bevorzugt über mehr oder weniger dekondensierten Abschnitte -den Puffs- vorkommen (Pelling, 1964, 1969), bei den in

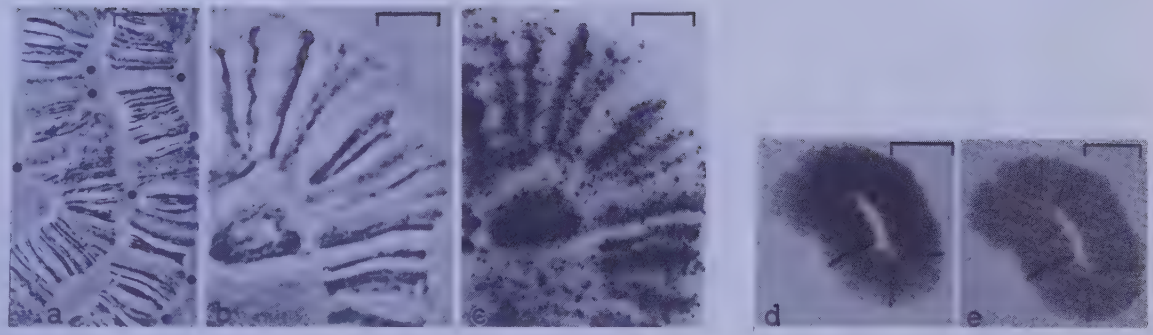


Abb. 27 a – c:

Scheinbare Analogie zwischen den Puffs (.) in situ befindlicher Chromosomen (a) und verquollenen, interkalaren Chromosomenabschnitten isolierter Chromosomen (b). Paradoxerweise zeigen die in (b) kontrastreichen, stärker kondensierten, in (d/e) metachromatisch gefärbten Banden, in Autoradiographien 3H-UTP-Einbau (c). Phasenkontrast, Hämalaun-Färbung. Maßstab 10 µm.

(d/e) Auf Objektträger übertragene, nativ isolierte Chromosomen werden mit 0,1 % TOLUIDINBLAU (Merck) in 0,1 M Acetatpuffer, pH 5.5, 10 Minuten gefärbt. Zur Differenzierung der Färbung saugt man einige Tropfen folgender Salzlösung (0,4 M KCl; 0,15 M $S.-PO_4$-Puffer, pH 5.5) unter dem Deckglas hindurch. In 1 – 2 Minuten färbt sich die DNA metachromatisch grünlich, RNA-haltige Banden rot-purpur. (d) Chromosom I von Chironomus tentans während, (e) nach der Differenzierung. Hellfeld-Aufnahme. Maßstab 10 µm. Nicht fixiert.

zellfreien Systemen inkubierten Riesenchromosomen die Silberkörner über den kondensierten Abschnitten. Die weniger kondensierten, interkalaren Chromosomenabschnitte zeigen kaum Markierung. Bei Kurzzeitmarkierung ist die Verteilung der Silberkörner über den kontrastreichen Querbanden ziemlich gleichmäßig. Nur wo zwei oder mehrere, markierte Querbanden eng beieinanderliegen, ist die Markierung intensiver (Abb. 27 c; 28 a, c, d).

Die Markierung der kondensierten Banden ist salzabhängig. Man findet gesteigerte Markierungsintensität bei höherer Salzkonzentration. Im Konzentrationsbereich von 140 - 180 mM NaCl herrscht die Markierung der Nukleolen und Balbianiringe vor. Im Gegensatz zu den isolierten Kernen zeigen alle strukturell erhaltenen Chromosomen Markierung (Tab. 7). Bei Inkubation mit 200- 250 mM NaCl treten die Nukleolen und Balbianiringe noch immer durch stärkere Markierung hervor, doch ist die Bandenmarkierung ausgeprägter. Auch in diesem Konzentrationsbereich bauen alle Riesenchromosomen 3H-UTP ein. Völlig beseitigt ist der Unterschied in der Markierungsintensität von Balbianiringen, Nukleolen und Banden im Konzentrationsbereich von 340 - 400 mM NaCl (vgl. Abb. 29a, b, c). 300 mM Saccharose oder 30 mM NaCl bewirken in ähnlicher Weise wie 340 - 400 mM NaCl eine Dekondensation, also das Auseinanderweichen der Einzel-Chromatiden im polytänen Kabelverband. Doch nur das hohe Salz stimuliert die RNA-Synthese in den Banden. Niedriges Salz (30 mM NaCl) stimuliert die RNA-Synthese vor allem in den Nukleolen und nur wenig in den Banden, während 300 mM Saccharose trotz der gleichen, morphologischen Veränderungen keinen stimulierenden Einfluß auf die RNA-Synthese-Aktivität hat. Isolierte Riesenchromosomen bauen kein 3H-UTP ein, wenn dem in Tab. (7) angegebenen INK-Medien Magnesium oder Mangan fehlt. Calcium kann Mg^{++} oder Mn^{++} nicht ersetzen und hat auf die RNA-Synthese-Leistung eine inhi-

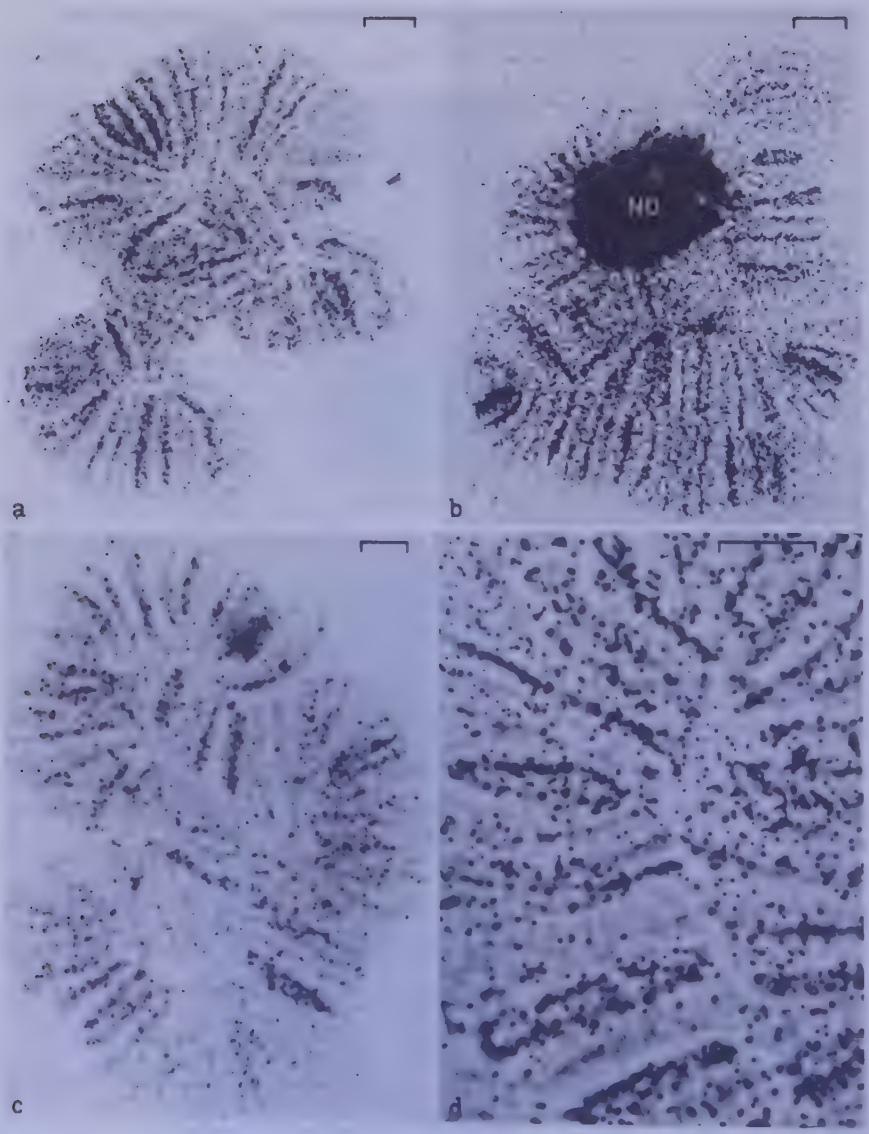

a
b
c
d

Abb. 28:

Autoradiographien nativ isolierter Speicheldrüsen-Chromosomen I (a, b, d), II (b) von Chironomus tentans nach 30 - 60 Sekunden Einbau von 3H-Uridintriphosphat in 340 - 360 mM NaCl (s. zur übrigen Zusammensetzung des Mediums Tab. 7). 60 - 80 stärker kondensierte Abschnitte, der durch diese NaCl-Konzentration dekondensierten Riesenchromosomen I (a, c), sind ziemlich gleichmäßig markiert. "Interbanden" zeigen bei solcher kurzen Pulslänge kaum Silberkörner. Die bei kurzfristiger Inkubation strukturell erhaltenen Nukleolen (NO) markieren intensiv (b). Hämalaun-Färbung. Durchlicht. Maßstab 10 µm.

bierenden Einfluß. Der Einbau ist gleich intensiv, ob man 1.0 - 2.0 Mg^{++} oder 2.0 mM Mn^{++} verwendet. Hingegen sind bei einer NaCl-Konzentration von 140 mM und 15 mM Mg^{++} die Riesenchromosomen nur in den Nukleolen und Balbianiringen schwach markiert.

Versetzt man solche im Standard-Medium isolierten, in vitro markierten Riesenchromosomen mit TOLUIDINBLAU (s. Legende zu Abb. 27 d/e), so färben sich native Riesenchromosomen bei pH 5.5 in weniger als 60 Sekunden vollkommen rot-purpur. Bei der Differenzierung der Färbung (1 - 5 Min.) beobachtet man einen Farbwechsel. In den Chromosomen tritt eine Farbänderung nach kürzeren Wellenlängen hin auf, sodaß die DNA grünlich scheint, während solche kondensierten Banden, die sich in den Autoradiographien durch Markierung auszeichnen, ebenso wie die Balbianiringe, Nukleolen und Droplets, metachromatisch rot gefärbt sind, d. h. sie enthalten RNA, Abb. (27 d/e). Heterochromatische Regionen, also transkriptionell inaktive Regionen, wie etwa das Kinetochor bei Chironomus melanotus, färben sich nicht metachromatisch rot, sondern grün. Diese Toluidinblau - Färbung ist nur für nicht-fixierte IS-Chromosomen oder Kerne anzuwenden. Bei Einwirkung von Äthanol-Eisessig (3:1) verschwindet die Färbung. Mit der gleichen Mischung vorfixierte IS-Chromosomen färben sich nur noch orthochroma-

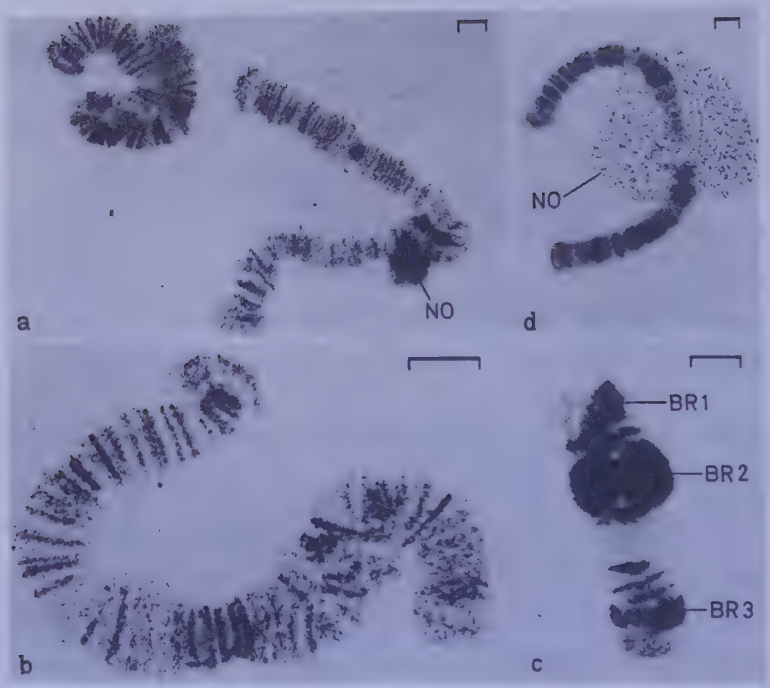


Abb. 29:

3H-UTP-Einbau nativer Riesenchromosomen im zellfreien System in 340-360 mM NaCl. Im Gegensatz zu den in Abb. (28) gezeigten Chromosomen, wurden diese Chromosomen 1-3 Min. in hohem Salz inkubiert und in 0.15 M NaCl rekondensiert. Balbianiringe (c), Nukleolen (b) und verschiedene Banden (a-c) sind stark markiert. Abb. (d) zeigt die RNA-Syntheseleistung eines niemals dekondensierten, sondern mittels 10-15 mM $MgCl_2$ (0.13 M NaCl) überkondensierten Chromosoms. Solchen Chromosomen mit stark zusammengepreßten Chromatiden fehlt die Polymerasen-Aktivität in den Banden. Die aufgelockerten NO (und BR) zeigen Markierung. Die Strukturerhaltung der NO ist immer besser als in hohem Salz. Hämalaun-Färbung. Durchlicht. Maßstab 10 µm.

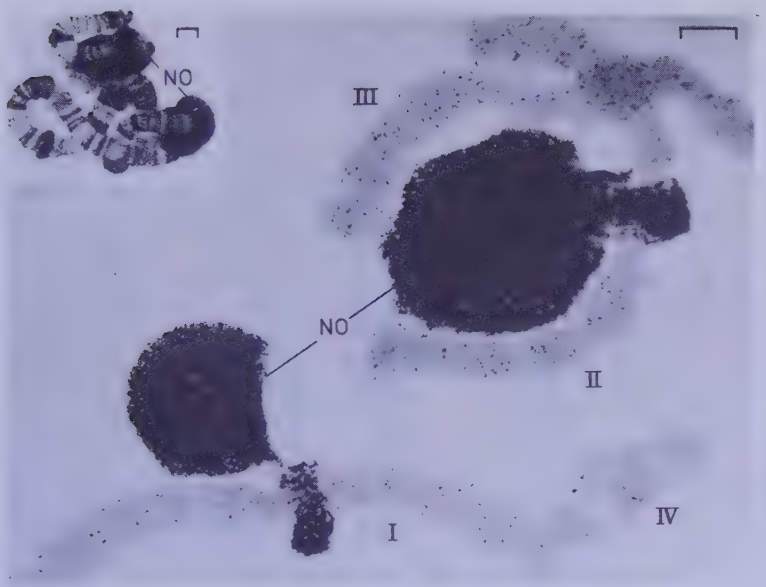


Abb. 30:

Wirkung von alpha-Amanitin im Überschuß (40 µg/ml-Kontrolle) auf die RNA-Synthese-Leistung isolierter Chromosomen von Chironomus tentans (Hedy). In vitro 10 Minuten mit alpha-Amanitin und 3H-Uridintriphosphat inkubierte Chromosomen, zeigen lediglich Polymerisations-Aktivität des Nukleolus-spezifischen Enzyms A (I). Die Markierung fehlt in den Balbianiringen des Chromosoms IV und in allen Banden der Chromosomen I-IV, was die Hemmung der Chromosomen-gebundenen Polymerase B (II) widerspiegelt.
Inset: Zum Vergleich mit Abb. (28, 29, 30) die normale B (II)-, A (I)-Aktivität in vivo, 10 Minuten nach oraler Injektion von 3H-Uridin (spez. Aktivität, 24 Ci/mMol).
Durchlicht. Hämalaun-Färbung. Maßstab 10 µm.

tisch, also blau. Werden isolierte Riesenchromosomen unmittelbar vor dem 3H-UTP-Puls mit alpha-Amanitin im Überschuß (40 µg/ml) für 10 Min. behandelt und können dann in weiterer Gegenwart von alpha-Amanitin die radioaktive Vorstufe einbauen, so fehlt die Markierung über den Balbianiringen und Banden (n=73), Abb. (30).

NaCl (mM)	SUMME DER UNTERSUCHTEN IS-CHROMOSOMEN Davon sind markiert	nicht markiert	MARKIERUNGSINTENSITÄT NO	BR	BANDEN
140 - 180	141	- -	++	++ +++	+
200 - 250	122	- -	+++	+++	++
340 - 400	111	- -	+++	+++	+++

Zusätzlich enthielten alle INK-Medien:

0,1 mM Dithioerythreitol (DTT)
2.0 mM Manganchlorid
0,2 mM ATP, CTP, GTP; 1 uCi/ml 3H-UTP
20 mM TRIS-HCl, pH 7.3

Pulsdauer 1 - 5 Min. bei 25°C

Signatur:

\+ = schwache Markierungsintensität
++ = starke Markierungsintensität
+++ = sehr starke Markierungsintensität

NO = Nukleolen
BR = Balbianiringe

Tab. 7:

3H-URIDINTRIPHOSPHAT-INKORPORATION ISOLIERTER RIESENCHROMOSOMEN

NaCl – (mM)	SUMME DER UNTERSUCHTEN IS-CHROMOSOMEN Davon zeigen: AMANITIN-Einfluß			keinen AMANITIN-E.			keine MARKIERUNG		
	NO	BR	BANDEN	NO	BR	BANDEN	NO	BR	BANDEN
	(i.e. +++	—	—	+++	+++	++	—	—	—
a) 140 plus 40 µg/ml für 10 Min. –Aman. b) 180 – 230 plus 40 µg/ml für 10 Min. –Aman.	73			—			—		

Vgl. ansonsten Tab. 7

Tab. 8:

3H-URIDINTRIPHOSPHAT-INKORPORATION ISOLIERTER RIESENCHROMOSOMEN IN GEGENWART VON alpha-AMANITIN

3.3. Experimentelle Veränderungen des Puffmusters durch DMSO

Anlaß zur Verwendung von DIMETHYLSULFOXID (DMSO) war eine zufällige Beobachtung. Im Rahmen der Spreitungsexperimente wurde unter anderem versucht, die Membranstabilität polytäner Kerne durch DMSO abzuschwächen. Es ist bekannt, daß DMSO Membranen beeinflußt, Rammler und Zaffaroni, (1967). Berry und Dietz, (1968) berichten von in vitro-Experimenten mit DMSO-inkubierten Speicheldrüsen von Chironomus thummi, daß DMSO die Poren polytäner Kerne beträchtlich weite.
In Vorversuchen ergaben sich unter bestimmten Bedingungen Veränderungen des Balbianiring-Musters. Verschiedene andere Agenzien wie ADENOSIN, ACTINOMYCIN D (Beermann, 1966), alpha-AMANITIN (Beermann, 1971), GALAKTOSE (Beermann, 1973) induzieren ebenfalls Veränderungen des Puffmusters. Während ACTINOMYCIN D, ADENOSIN, alpha-AMANITIN die RNA-Synthese-Aktivität aller Banden inhibieren, - sofern sie in vivo in die Kerne eindringen können (s. Beermann, 1971) - demgegenüber ist die Wirkung von DIMETHYLSULFOXID in vivo differenzierter, d.h. kein "Abschalten" der Transkription in allen Puffs.

Als Untersuchungsmaterial dienten 1 - 2 Monate alte Laborkulturen von Chironomus tentans (Hedy). Die Tiere wurden unter den üblichen Kulturbedingungen (s. MM) bei 18°C aufgezogen und direkt dem DMSO ausgesetzt. Vor allem Larven des 4. Stadiums wurden für die Experimente verwendet.

Getestet wurden DMSO-Konzentrationen von 0,5 - 20 %. Bei 10 % DMSO sind die Ergebnisse am eindeutigsten. 20 % überleben die Larven nicht, während sie in 2 % DMSO 4 - 6 Tage und in 0,5 % noch länger gehalten werden können. Allerdings sind die während der Langzeitbehandlung erzielten Effekte nicht die gleichen, wie sie unter dem Einfluß von 10 % DMSO in einigen, wenigen Stunden erzielt werden (s.u.).

DMSO hat schon äußerlich einen deutlichen, zeitabhängigen Einfluß auf die Larven. Während der ersten Stunde in 10 % DMSO sind die Larven verhältnismäßig aktiv, bauen aber keine Tuben. In den folgenden 2 Stunden nimmt ihre Mobilität mehr und mehr ab. Die Schlängelbewegung der Larven

geht in unkoordinierte Bewegung über, schließlich ist nur noch ein gelegentliches Zucken zu beobachten. In der Regel liegen die Larven nach 2 - 3 Stunden DMSO-Einwirkung bewegungslos auf dem Boden des Glasgefässes. Die Segmentierung des Larvenkörpers tritt deutlicher hervor und die dunkelrote Färbung verstärkt sich. Der Turgor läßt nach und die Larven sind auffallend schlaff. Auf den ersten Blick scheinen die behandelten Larven tot zu sein. Überträgt man sie jedoch in frisches, DMSO-freies Wasser, so werden die Tiere innerhalb von 60 Minuten wieder beweglich. Zunächst beobachtet man nur einige Zuckungen, und nach 2-3 Stunden setzt allmählich ein unregelmäßiges Schlängeln ein, das sich im Laufe der nächsten 6 - 8 Stunden normalisiert. Während der ersten Stunden der Erholung kehren die hellrote Körperfärbung und der Turgor der Larven zurück.

Die Chromosomen-Analyse im Quetschpräparat ergab, in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer, bestimmte Veränderungen der Balbianiring-Situation. Eine ausführliche Beschreibung des normalen Balbianiring-Musters findet sich bei Beermann (1973) und erübrigt sich hier. Der auffälligste Effekt der DMSO-Behandlung (10 %) ist die ungewöhnliche, übermäßige Expansion des BR 3. Innerhalb von 2 - 3 Stunden in DMSO entwickelt dieser BR die Ausmaße eines voll entfalteten BR 2 oder BR 1 (Ø ca. 25-30 um), vgl. Abb. (31 a-d) und Abb. (32), was in der Normalsituation noch niemals beobachtet wurde. Etwa im gleichen Zeitraum bilden sich BR 1 und BR 2 zurück, sodaß endlich nur der übermäßig vergrößerte BR 3 übrigbleibt. Das BR-Muster in den Speicheldrüsen-Kernen ein und derselben Larve ist einheitlich; dagegen gibt es Unterschiede von Larve zu Larve. Zwar ist in der Regel in nahezu allen untersuchten Tieren bzw. Speicheldrüsen-Kernen (n=461), der BR 3 stimuliert (s. Tab. 9), - lediglich 2 von 17 Larven

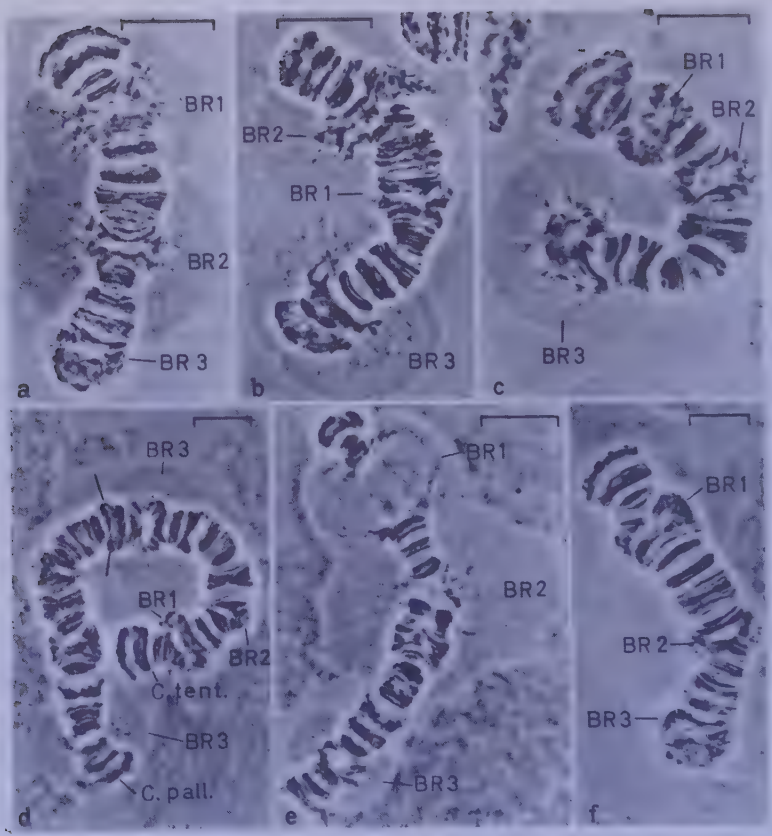


Abb. 31:
Veränderungen des Balbianiring-Musters im Chromosom IV durch 10% DMSO in vivo bei 18°C.

a) Kontrolle — Chironomus tentans (=Normalsituation)
b) 3 Std. 10% DMSO : Chironomus pallidivittatus
c) 3 Std. 10% DMSO : Chironomus tentans (Hedy)
d) 3 Std. 10% DMSO : Kreuzung von Chironomus tentans (Hedy) x Chironomus pallidivittatus, F_1-Hybrid. Die Kontaktzone der beiden, nicht gepaarten, Homologen ist (〉) gekennzeichnet. Lediglich BR 3 wird in diesen Stunden stimuliert und erlangt eine Querschnittsbreite, die er in der Normalsituation niemals erreicht. Hingegen rekondensieren BR 1 und BR 2 in der Regel.
e) 4-6 Std. 10% DMSO: Diese Behandlung führt zu einer dramatischen Dekondensation des BR 1, BR 2, welche diejenige der Ringe in der Normalsituation bei weitem übertrifft.
f) 10-14-20 Std. 10% DMSO u. 30-60 Min. DMSO (-) in vivo: Alle 3 Balbianiringe im Chromosom IV von Chironomus tentans (Hedy) sind vorübergehend rekondensiert.

Phasenkontrast. Karmin-Essigsäure-Färbung. Quetschpräparate. Maßstab 10 µm.

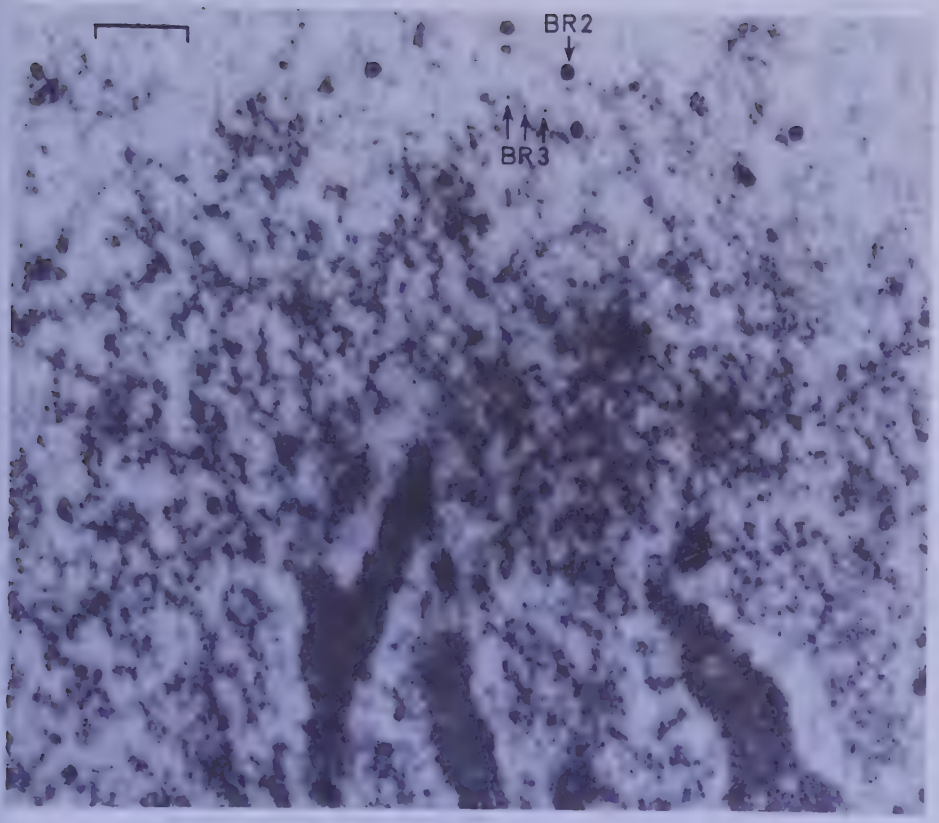


Abb. 31 g:
Transkriptions-Produkte des Balbianiringes 3 im elekronenoptischen Bild. Im Gegensatz zu den 300-500 A dicken BR 2-RNP-Grana (s.o.im Bild), besitzen die ebenfalls granulären, aber immer kleineren BR 3-Produkte 130-200 A Durchmesser.Der BR 3 von C.tentans,C.pallidivittatus, C.melanotus und C.thummi weicht in der Granagröße von allen bisher bekannten Balbianiringen ab.
x 72000 Maßstab 0.25 µm. Ultradünnschnitt.

BR 1 / BR 2 / BR 3

LARVE	+/++/+	+/+/++	-/+/++	+/-/++	-/-/++	++/-/++	++/+/++	++/++/++	-/-/±
1 Kontrolle	21								
2 Kontrolle	19								
1			7		24				
2					31				
3					18	8			
4							5	29	
5							24		
6		24							
7						27	8		
8					26				
9			7	19					
10					3				25
11			3	21					
12					32				
13					4	24			
14					9	17			
15									20
16				3	22				
17				16	5				

Summe der untersuchten, behandelten Chromosomen IV: 461

Signatur: + = intermediäres Puffing
++ = starke Expansion
- = schwaches oder kein Puffing

Tab. 9:

Das Balbianiring-Muster von Chironomus tentans (Hedy) nach 3 Stunden 10 % DIMETHYLSULFOXID in vivo bei 18°C (s. Text)

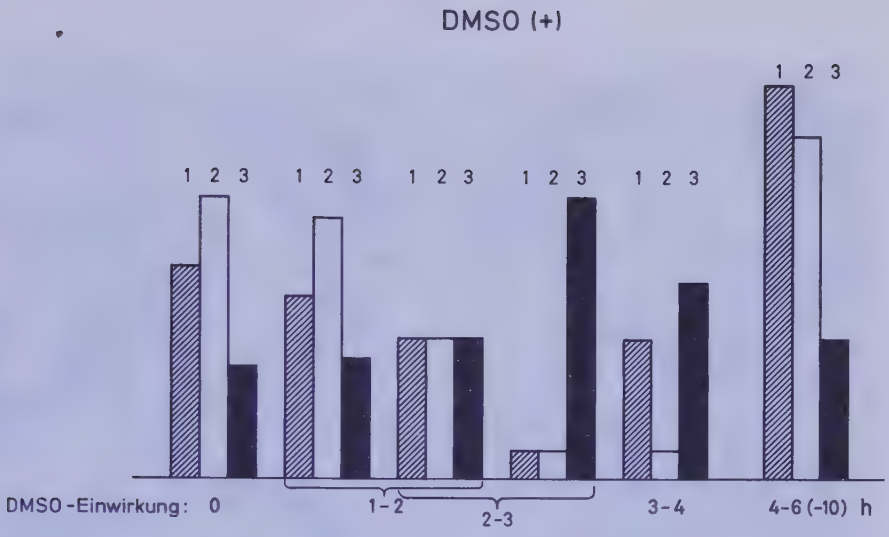


Abb. 32:
Schema der zeitabhängigen Änderungen des Balbianiring-Musters im Chromosom IV von Chironomus tentans(Hedy) durch 10% DIMETHYLSULFOXID(DMSO) in vivo bei 18°C.

von Chironomus tentans (Hedy) zeigen keine Reaktion, - doch variiert der Entfaltungszustand von BR 1 und BR 2, d.h. in einigen Fällen sind BR 1 und BR 2 neben BR 3 weiter expandiert (s.Tab. 9). Dies kann als zeitliche Verschiebung der Reaktion von BR 1, BR 2 und BR 3 auf die DMSO-Behandlung gedeutet werden (Abb. 32).

Im Ultradünnschnitt-Präparat zeigt der (nach 2 - 3 Stunden durch 10% DMSO in vivo) stimulierte BR 3 zwar ebenso wie der nichtstimulierte BR 3 gestielte und gleich große, mengenmäßig aber wesentlich mehr RNP - Grana(vgl. dazu Abb. 31 g). Diese kann man jedoch nur schlecht identifizieren, da sie kontrastärmer sind und stets einen geringeren Durchmesser (130 - 200 A) haben, als die für die Balbianiringe 2 und 1 lokusspezifischen Tran -

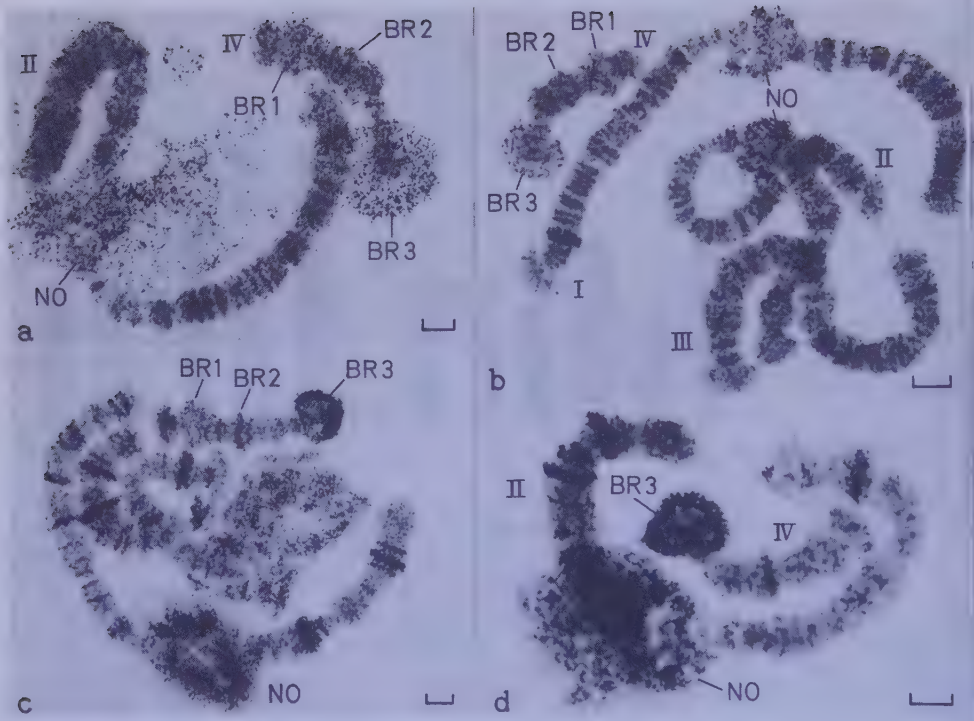


Abb. 33:

3H-Uridin-Einbau (spez. Akt. 24 Ci/mMol - 10 Min.) in situ befindlicher Speicheldrüsen-Kerne von Chironomus tentans (Hedy) nach vorausgegangener in vivo-Behandlung der Larven mit 10 % DMSO für 3 Stunden bei 18°C. Der stimulierte BR 3 zeigt, seiner Größe entsprechend - neben dem Nukleolus - die meiste Markierungsintensität. BR 1 und BR 2 sind, betrachtet man die Ringgröße als Maß für die RNA-Synthese-Leistung, in schwach und stark markierten Präparaten gleichermaßen reprimiert. Andere Puffs können zur gleichen Zeit offensichtlich radioaktives Uridin einbauen.
Maßstab 10 µm. Durchlicht. Hämalaun-Färbung.

skriptionsprodukte (300 - 500 A). Was die Kernmembran anbetrifft, so ist bis auf eine gelegentlich sichtbare Vergrößerung der Kernporen, keine weitere, morphologische Strukturabwandlung sichtbar. Im Cytoplasma ist allerdings eine beträchtliche Größenzunahme der Mitochondrien und des granulären, endoplasmatischen Retikulums augenfällig. Die Ribosomen sind nicht verändert.

Inkubiert man mit DMSO vorbehandelte Speicheldrüsen mit tritiiertem Uridin, so zeigt der BR 3, entsprechend seiner Größe, die stärkste Markierungsinten-

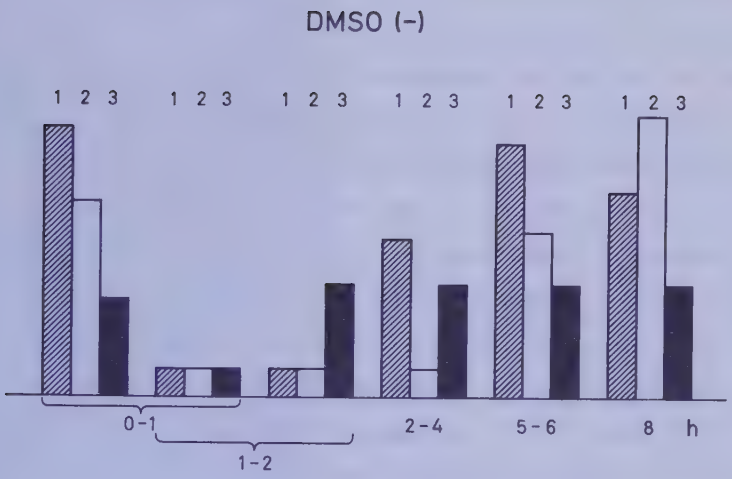


Abb. 34:

Erholungsphase. Schema der zeitabhängigen Änderungen des Balbianiring-Musters im Chromosom IV von Chironomus tentans (Hedy) unmittelbar folgend auf die in Abb. (32) dargestellte, vorangegangene DMSO-Behandlung in vivo. In frisches Wasser (Leitungswasser: 0,06 % NaCl-haltiges Aqua dest., 1:3) übertragene Larven rekondensieren vorübergehend alle Balbianiringe im Chromosom IV. BR 3 dekondensiert während der 1. - 3. Stunde als erster Puff, gefolgt vom stärker dekondensierenden BR 1. Etwa 8 Stunden nach der DMSO-Behandlung ist die normale Hierarchie im BR-Muster wieder vorhanden.

sität. Die Schwärzung der kollabierten BR 1 und BR 2 ist gering oder fehlt vollkommen (Abb. 33 a-d). Solche Bilder kommen in schwach und stark markierten, autoradiographischen Präparaten bei gleicher Expositionszeit (10 Tage) vor. Andere Puffs bauen offensichtlich 3H-Uridin ein. Nach 3 Stunden DMSO-Behandlung setzt in den inzwischen regungslosen Larven eine weitere, drastische Abwandlung des BR-Musters ein. Der BR 3 verringert seine Größe auf 18 - 15 µm Breite, während nun der BR 1 und in der Regel auch der BR 2, zu einer Größe "aufschießen" (~33µm), die ihre Dimension unter den üblichen Kulturbedingungen bei weitem übertrifft (Abb. 31 e).

Bis zu 90 % der Larven zeigt während der 4. - 6. Stunde dieses BR-Muster. Selten wurde der Zustand auch noch nach 10 Stunden vorgefunden. In der Regel sehen die Balbianiringe nach 8 - 10 Stunden DMSO-Behandlung etwas kleiner und ungewöhnlich transparent aus. Sowohl während der 1. - 2. und während der 4. - 6. Stunde sind die Balbianiringe 1 und 2 im Glutaraldehyd-fixierten Speicheldrüsen-Präparat mit zahlreichen RNP-Droplets übersät. Der BR 3 zeigt auch in der Phase seiner größten Ausbildung niemals Droplets. Im EM-Bild sind bereits nach 20 Minuten kleine Droplets bei BR 1 und BR 2 erkennbar. Es sind sternförmige Komplexe, die sich aus einem 0.1 - 2 um dicken, dichten core und zahlreichen, ihm aufsitzenden, gestielten 300 A RNP-Grana zusammensetzen (Abb. 35a). Nach 4 - 6 Stunden DMSO (10 %) finden sich in den Balbianiringen 1 und 2 neben annähernd sphärischen Droplets auch v-förmig gebogene, schleifenartige Kondensate von 3 - 6 µm Länge und ziemlich gleichmäßiger Breite (Abb. 35b).

Die durch 10 % DMSO induzierte Aktivitätssteigerung bzw. Reprimierung der Balbianiringe in vivo ist nur von kurzer Dauer. Schon während der ersten Stunde nach Absetzen der DMSO-Behandlung (s. Abb. 34), beobachtet man, auch nach verhältnismäßig langer DMSO-Behandlung (10 - 20 Stunden), die vorübergehende Rekondensation aller Balbianiringe (s. Abb. 31f). Dieser Prozeß verläuft unterschiedlich schnell. Die Wiederausbildung der Balbianiringe beginnt in der 1. - 3. Stunde der Erholungsphase. Zuerst wird der BR 3 ausgebildet. Er erreicht aber jetzt keine übermäßige Größe mehr. Die BR 1-Region beginnt sich während der 2. - 4. Stunde zu dekondensieren. In der Regel bildet sich zuerst der BR 1 (vor dem BR 2) und manifestiert sich cytologisch als der größte Ring. Etwa 8 Stunden nach dem Absetzen der DMSO-Behandlung hat die "Umpolung" von BR 1 und BR 2 stattgefunden, sodaß der BR 2 der größte Balbianiring ist und da-

0,2 µm
a
0,2 µm
5 µm
b

Abb. 35:

a) Ribonukleoprotein-Ansammlungen im BR 2 und BR 1 nach Behandlung der Larven mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in vivo bei Zuchtraumtemperatur (18°C). Die sternförmigen Droplets bestehen aus einem elektronendichten core und diesen umgebenden, gestielten BR-Grana, deren Stiele möglicherweise die core-Region aufbauen (s. Inset). Der Granadurchmesser beträgt 300 - 500 A.

b) 4- 6 Stunden Einwirkung von 10 % DMSO in vivo induzieren vorübergehend größere RNP-Ansammlungen am BR 2 und BR 1. Solche RNP-Mengen sind ihrer Größe und ihres Kontrastes wegen bereits lichtoptisch erkenntlich (s. Inset in Abb. (b). In Ultradünnschnitten finden sich am BR 2, BR 1, niemals aber am BR 3, neben solchen sphärischen Droplets auch v-förmig gebogene, schleifenförmige Kondensate von 3 - 6 µm Länge, umgeben von 300 A-RNP-Grana.

mit die normale Balbianiring-Hierarchie im Chromosom IV von Chironomus tentans wieder besteht.

3.4. RNA-Synthese der veränderten Puffs in situ und in isolierten Riesenchromosomen

Die in vivo-Markierung mit 3H-Uridin (10 Minuten) entspricht bei und nach DIMETHYLSULFOXID-Behandlung den veränderten Größenverhältnissen der Balbianiringe. Während in der Normalsituation der Balbianiring 2, als der größte Puff, die meiste Markierung zeigt (vgl. auch Pelling, 1964), weisen die unter der Einwirkung von 10 % DMSO verkleinerten Balbianiringe 2 nur noch etwa soviele Silberkörner auf, wie der BR 3 (Abb. 36b, Tab. 10). Ist der BR 2 vollständig reprimiert (Abb. 36c), so ist über der BR 2-Region keine Markierung mehr zu beobachten. Dieses Resultat findet sich ebenso zu Beginn der Erholungsphase nach Absetzen des DMSO und 2-

3 Stunden Erholung bei 18°C, vgl. Tab. (10, VI) und Abb. (36d). Ist der BR 2 in der Erholungsphase bereits dekondensiert, ist er in der Regel wieder markiert (s. u.).
Larven, bei denen alle 3 Balbianiringe im Chromosom IV durch eine verhältnismäßig lange Dimethylsulfoxid-Behandlung (14 Stunden 10 % DMSO) und Übertragung der Larven in frisches Wasser ohne DMSO bei 18°C in vivo rekondensiert wurden, zeigen folgende Markierungsbilder:

1) Zu Beginn der Erholungsphase, d.h. 30 - 60 Minuten nach der DMSO-Behandlung, ist mit Ausnahme der Nukleolen weder über den BR 3, 1, 2-Regionen noch anderen Banden, 3H-Uridin-Einbau erkennbar, (Abb. 36 h, 37 a). Daneben findet man in den Präparaten auch Kerne ohne jede 3H-Uridin-Inkorporation; ein normaler Markierungsbefund in Speicheldrüsen von Chironomus tentans, den Pelling (1964) und Beermann (1971) schon beschreiben.

2) Es gibt Chromosomen IV mit reprimierten Balbianirngen 2, 1, 3, die über den BR-Regionen frei sind von Markierung, während andere Banden in den gleichen Chromosomen IV, etwa zwischen BR 1 und BR 2 gelegene Banden und andere Abschnitte in den Chromosomen I, II, III markiert sein können (Abb. 37 b). Die Regression der 3 Balbianiringe im Chromosom IV von Chironomus tentans nach der vorausgegangenen DMSO-Behandlung in vivo, ist offensichtlich mit gleichlaufenden Änderungen in deren RNA-Syntheseaktivität verbunden.

3) Beginnen die BR-Regionen im Chromosom IV schon während der 1. - 2. Stunde der Erholungsphase bereits mit dem Puffing, sind sie in gleicher Weise wie andere Banden, d.h. als "Querscheibe" markiert, da ihnen die

VERSUCHSABLAUF	BR-MUSTER / n markierter Chromosomen IV						z.B.Abb.:
	1 2 3 +/++/+	-/+/++	-/-/++	++/-/+-++	++/+/++	-/-/-/	
I Orale Injektion von 1µCi/ml 3H-URIDIN, spez.Aktivität 24 oder 46 Ci/mMol KONTROLLE	45						36 a
II Explantierte Speicheldrüsen inkubiert in: 110mM NaCl; 15mM Sörensen-Phosphat-Puffer, pH 7.0; 100µCi/ml 3H-URIDIN KONTROLLE							
III Expl.Sp.-Drüsen 1-2 Std.mit 10% DMSO bei 18°C in vivo behandelter Larven können in: 110mM NaCl; ± 1% DMSO; 15mM S.-PO_4-Puffer, pH 7.0; 100µCi/ml 3H-URIDIN, die radioaktive Vorstufe einbauen					27		b
IV Expl.Sp.-Drüsen 3 Std.mit 10%DMSO in vivo behandelter Larven können im INK-Medium (s.III) 3H-URIDIN einbauen		24	40	36	12		c, e f, g
V Expl.Sp.-Drüsen 14, max. 20Std. mit 10% DMSO, 30-120 Min. mit frischem Wasser (Leitungswasser: 0,06% NaCl-haltiges Aqua dest.1:3) in vivo behandelter Larven können im INK-Med.(s.II)3H-URIDIN einbauen			-/-/+ 21	+-++/-/+ 53		19	h
VI Expl.Sp.-Drüsen 10 Std.mit 10%DMSO, 3 Std.mit frischem Wasser (s.V.) in vivo behandelter Larven können im INK-Med.(s.II) 3H-URIDIN einbauen				++/-/+-++ 23	24		d
VII Nativ isolierte Chromosomen IV aus den Speicheldrüsen in vivo 10, max. 20 Std.mit 10%DMSO, 30-120 Min. mit frischem Wasser behandelter Larven mit reprimierten BR 1,2,3, können in vitro in 340-400mM NaCl(s.anson-sten Tab.7) 3H-URIDINTRIPHOSPHAT einbauen						26 Chromosomen zeigen Einbau über BR 1, 2 3	i, j k, l

Die Pulsdauer betrug bei I - VI 10 Min. bei 18°C; die Expositionszeit 9 - 12 Tage
" " " " VII 3 Min. bei 26°C; " " 4 - 8 Tage

Tab.10:
RNA-Synthese der durch 10 % DIMETHYLSULFOXID in vivo bei 18°C veränderten Balbianiringe im Chromosom IV von Chironomus tentans (Hedy), sowie der 3H-UTP-EINBAU nativ isolierter Chromosomen IV mit reprimierten Balbianiringen 1, 2, 3 in vitro

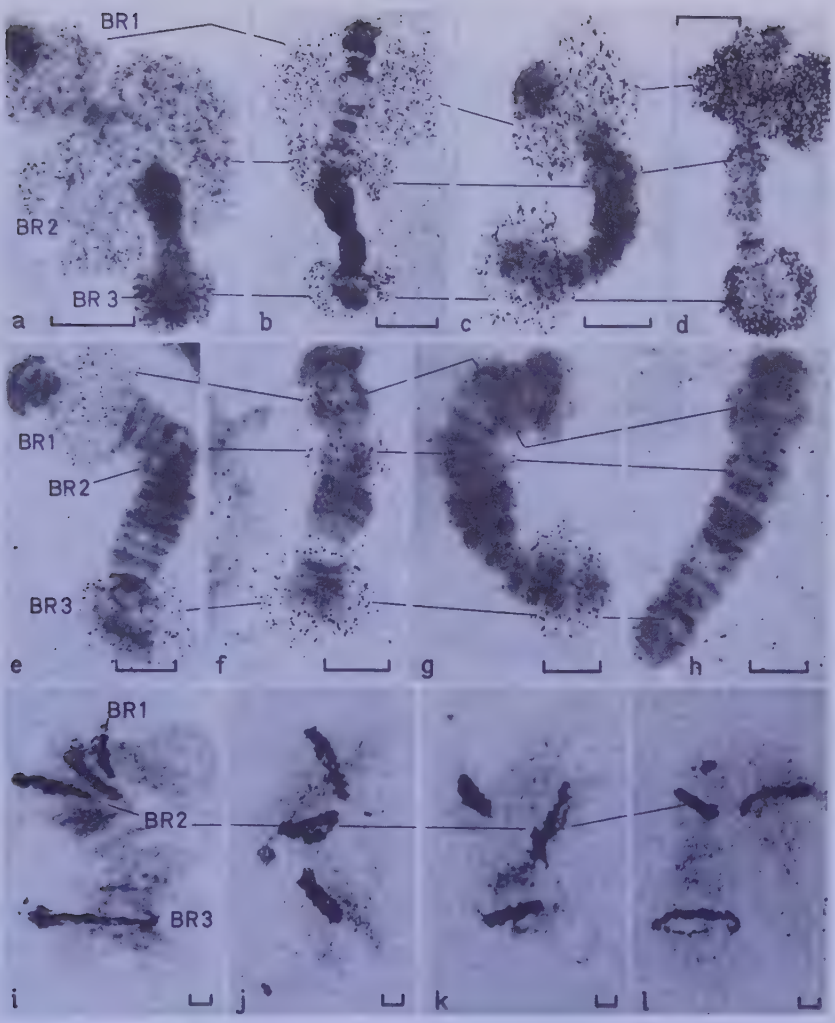


Abb. 36:
Zusammenhang zwischen Puffing und RNA-Synthese-Leistung der Balbianiringe 2, 1,3 im Chromosom IV mit 10% DMSO behandelter Larven von Chironomus tentans

I	Normales BR- und BR-Markierungsmuster (Kontrolle)	BR 1,2,3	in: a
II	Rekondensierende BR synthetisieren auf Grund ihrer geringeren Größe weniger RNA	BR 2	in: b,f
III	Stimulierte, d.h. stärker gepuffte BR zeigen vermehrten 3H-Uridin-Einbau	BR 1	in: b
		BR 3	in: b,c,d,f,g
IV	In vivo rekondensierte, also nicht gepuffte BR bauen kein radioaktives Uridin ein	BR 2	in: c,d,e,g,h
		BR 1	in: g,h
		BR 3	in: h
V	Nativ isolierte Chrom. IV aus DMSO-behandelten Larven mit rekondensierten BR-Regionen in vivo, zeigen in vitro, nach experimentell induzierter Dekondensation mittels 340-400mM NaCl, über den BR 2,1,3-Regionen intensiven Einbau von 3H-UTP		

Zum Markierungsverfahren bei I-IV, s. Tab. (10), bei V, Tab. (5),

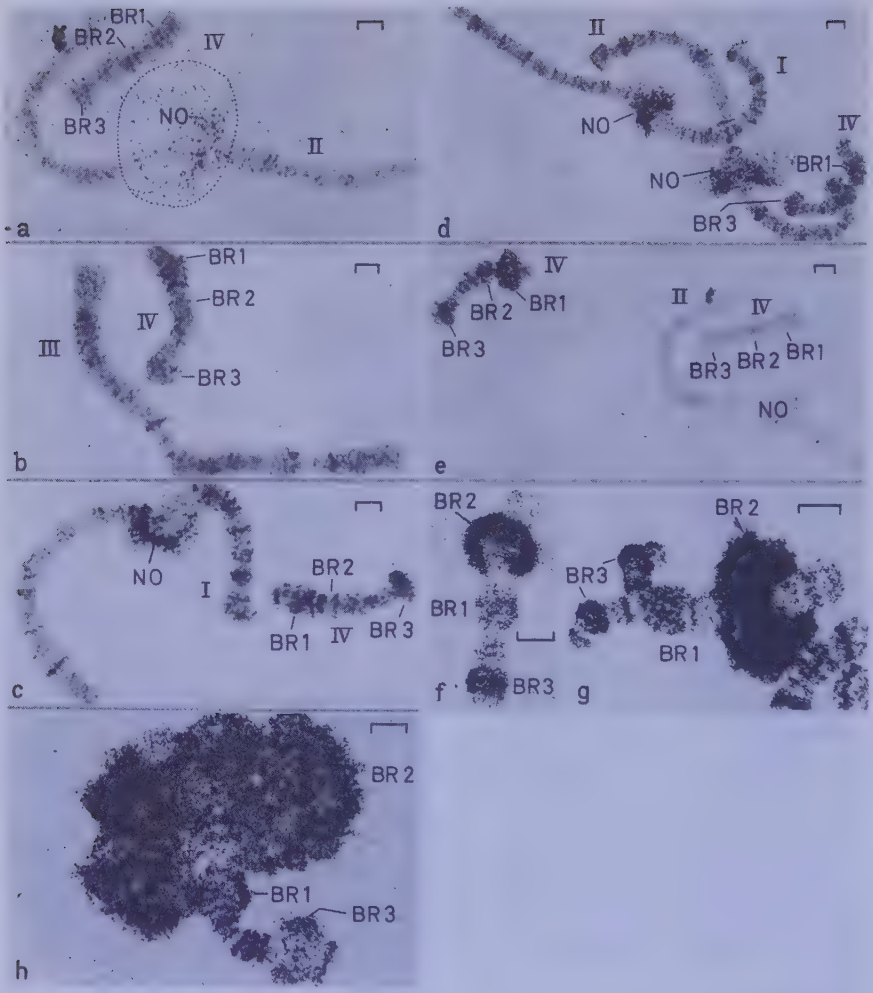


Abb. 37:

Einbau von 3H-Uridin in Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans (a-e) und Chironomus pallidivittatus (f-h) nach 14 Std. Vorbehandlung der Larven mit 10% DMSO in vivo bei 18°C. Kollabierte BR-Regionen im Chromosom IV bauen zu Beginn der Erholungsphase, d.h. 30-60 Min. nach der DMSO-Behandlung kein 3H-Uridin ein, während die Nukleolen sowie andere Banden transkriptionell aktiv sein können (a,b). Nach immer zuerst stattfindendem BR 3-Puffing (c,d) ist BR 1 in den nächsten Stunden der größte markierte Puff. Das Puffing und Einbauverhalten variieren von Zelle zu Zelle (e). Während der 4.-8. Stunde nach der DMSO-Behandlung setzt die BR 1-Regression und BR 2-Dekondensation ein, sodaß endlich die normale BR-Hierarchie wieder besteht (f,g). Zu Ringen umstrukturierte BR-Regionen stellen wieder die RNA-Synthese-aktivsten Genorte im Genom dar. Abb. (h) zeigt das in dieser Form seltene overshooting des BR 2. Die Markierung entspricht in jedem Fall den veränderten Größenverhältnissen. Durchlicht. Hämalaun-Färbung. Maßstab 10 µm.

typische Ringkonfiguration noch fehlt (Abb. 37 c,d). Die Nukleolen weisen die größte Silberkorndichte auf. Entsprechend der auch in der Erholungsphase zu beobachtenden, verzögerten oder vorauseilenden Reaktionen, d.h. der unterschiedlichen Intensität des einsetzenden BR 3, 1, 2 -Puffing, findet man in den autoradiographischen Präparaten Chromosomen IV mit verschieden großen und dementsprechend markierten Balbianiringen 3, 1 und 2. Die Markierung entspricht in jedem Fall den veränderten Grössenverhältnissen der Balbianiringe. Balbianiring 3 tritt anfänglich als der am stärksten markierte BR-Bereich hervor, während in den folgenden 2 - 6 Stunden der Erholungsphase BR 1 und BR 2 besonders augenfällig sind (s. Abb. 37 e, f, g). Sporadisch kann es zu einem extremen overshooting des BR 1 und/oder BR 2 kommen (Abb. 37 h). Vergleicht man Chromosomen IV mit gepufften BR-Regionen in schwach und stark markierten Präparaten, so fehlt in schwach markierten Chromosomen die, bei starker Markierung, sichtbare Schwärzung anderer Banden. Lediglich die entfalteten BR-Regionen sind markiert.

In einem Parallelexperiment wurde einem Teil der 14 Stunden mit 10% DMSO behandelten Larven, unmittelbar zu Beginn der Erholungsphase Aqua dest. injiziert, also der DMSO-bedingte Turgorabfall plötzlich ausgeglichen. Die Flüssigkeitsmenge variiert von 1 - 4 µl und richtete sich nach der Körpergröße einzelner Larven. In Übereinstimmung mit Abb. (34) rekondensieren auch in gespritzten Larven alle Balbianiringe zu Beginn der Erholungsphase. Das in den nächsten Stunden bei 18°C entstehende Puffmuster nichtgespritzter Larven unterscheidet sich jedoch von demjenigen in gespritzten Larven dadurch, daß bei letzteren alle BR-Regionen im Chromosom IV auch während der 2. - 4. (6.) Stunden reprimiert bleiben können. Abhängig ist das Anhalten der BR-Reprimierung von der Länge der voraus-

a
BR1
BR2
IV
5A
5C
b
BR1
2C
BR3
5C
BR2
d
c
BR1
2C
BR2
4C
5C
BR3
6A
e
III
BR6
f
BR6
NC
BR6

Abb. 38:

Nach 14 Stunden DMSO-Behandlung und nach anschließender Aqua dest.-Injektion entstandenes Puffmuster im Chromosom IV und III von Chironomus tentans (Hedy). An Stelle der aktivsten Genloci, d.h. der jetzt rekondensierten Balbianiringe 2, 1, 3 (vgl. Abb. 31a, 36a) bilden der Puff IV-5C und BR 6 in dieser Situation, die an Größe den normalen Balbianiringen durchaus entsprechenden und damit vorherrschenden Puffs im Genom (a-e). Abb. (f) zeigt zum Vergleich unter natürlichen Bedingungen entstandene Balbianiringe 6.
Karmin-Essigsäure-Färbung. Phasenkontrast. Maßstab 10 µm.

gegangenen DMSO-Behandlung und der Menge des injizierten Aqua dest. 20 Stunden DMSO-Vorbehandlung in vivo führen nach der Wasser-Injektion zu größeren Puffs als 8 Stunden einwirkendes DMSO. Verabreicht man mehr Aqua dest., zieht das eine längerwährende BR-Kondensation nach sich. Diese Beobachtung, wie sie für die Balbianiringe 2, 1 und 3 zutrifft, gilt nicht für alle anderen Banden des Chironomus-Genoms. Charakteristischerweise entsteht etwa 1-3 Stunden nach der Wasser-Injektion (in der Erholungsphase), in den BR-freien Chromosomen IV im Abschnitt IV-5C ein besonders prominenter Puff, der zu Ausmaßen anschwellen kann (ca. 25 µm), die den Dimensionen von BR 2 und BR 1 in der Normalsituation durchaus entsprechen (Abb. 38 a, b) und Tab. (11). Weiterhin können andere, kleinere Puffs im Chromosom IV in den Abschnitten 4C; 5A; 6A und 2C vorkommen (Abb. 38 c,d). Im Chromosom III kann man zur gleichen Zeit verschiedentlich einen, dem Puff IV-5C in der Größe entsprechenden, aufgeblähten Chromosomenabschnitt beobachten, - Balbianiring 6, (vgl. auch Beermann, 1973). Der so induzierte BR 6 entspricht in seiner Erscheinungsform natürlich entstandenen Balbianiringen 6 (vgl. Abb. 38 f).

In autoradiographischen Präparaten verhalten sich diese jetzt größten Puffs des Chironomus-Genoms so, wie die normalerweise am stärksten markierten Banden nichtbehandelter Larven. Die Markierungsintensität stimmt

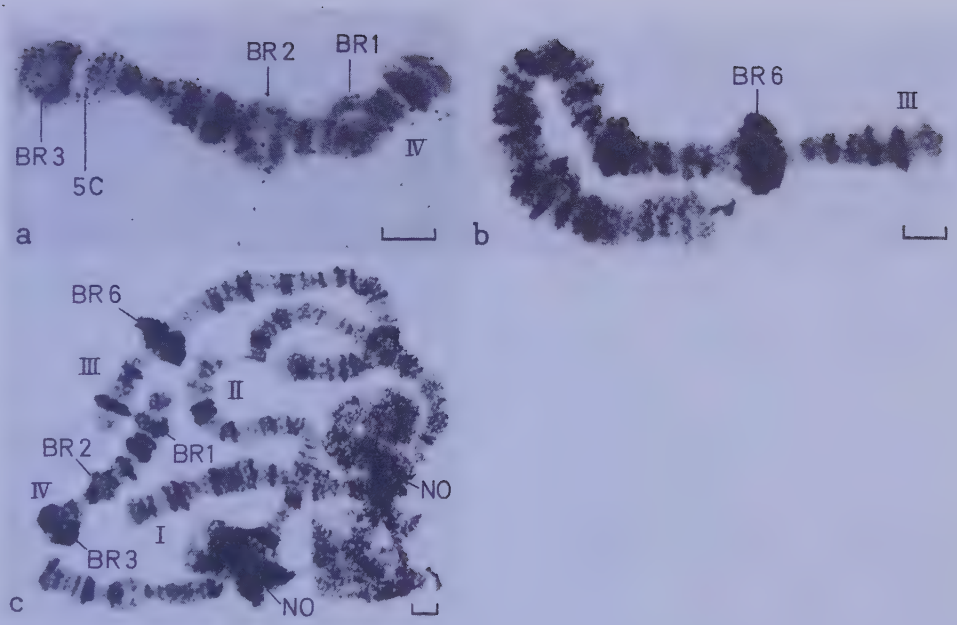


Abb. 39:

3H-Uridin-Einbau der in vivo nach 14 Stunden 10% DMSO und nach Injektion von Aqua dest. veränderten Puffs (s. Text).

a) In schwach markierten Autoradiographien zeigt der Puff IV-5C die größte Markierungsintensität; die normal aktivsten BR 2, 1, 3 zeigen keinen vergleichbaren Einbau.

b) Im Chromosom III von Chironomus tentans (Hedy) dominiert in schwach und stark markierten Präparaten BR 6 als RNA-Synthese-aktivster Puff.

c) Im späteren Stadium der Erholungsphase, d.h. mit allmählicher Rekondensation der Puffs IV-5C, sowie BR 6 und einsetzender Dekondensation des BR 3, zeigen BR 2, BR 1 (verglichen mit BR 6 und anderen Puffs) im Chromosom IV kaum Einbau radioaktiven Uridins. Ob das restliche Puffmuster unverändert ist, ist noch offen. Auffallend ist die Inversion im Chromosom IV.

Maßstab 10 µm. Durchlicht. Hämalaun-Färbung.

Versuchsablauf

14 Stunden mit 10 % DMSO behandelte Larven des 4. Stadiums aus einer Kultur, bekommen unmittelbar zu Beginn der Erholungsphase 2–4 µl Aqua dest. injiziert. 2–4 Std. nach dieser in vivo-Behandlung wurden die Speicheldrüsen explantiert und Quetschungspräparate angefertigt. 10–15 Chromosomen wurden in den Präparaten jeweils untersucht.
n der Larven (=15).

BR 1 / BR 2 / BR 3 (Anzahl der Chromosomen IV)				Puff 5 C (Anzahl der Chromosomen IV)				
+/++/+	-/-/-	-/-/±	++/±/+	-	±	+	++	
14	—	—	2	—	—	—	—	Kontrolle
—	131	35	48	17	29	86	52	

Tab. 11:

Das Puffmuster DMSO-behandelter Larven von Chironomus tentans (Hedy) nach Wasser-Injektion. An Stelle der normalerweise größten Balbianiringe 2, 1, 3 sind der Puff IV-5C und BR 6 vorübergehend die größten Puffs im Speicheldrüsen-Genom. Variationen im Puffmuster kommen von Tier zu Tier vor.

Signatur: ++ = starke Expansion
+ = intermediäres Puffing
± = schwaches Puffing
- = kein Puffing

in jedem Fall mit der Puffgröße, als dem sichtbaren Maß der RNA-Synthese-Leistung, überein. Im Gegensatz zu der intensiven Markierung der Puffs IV-5C, BR 6 und anderen Chromosomenabschnitten, bauen die rekondensierten BR 2, 1, 3-Regionen zur gleichen Zeit kein radioaktives Uridin ein. Beginnt der BR 3 mit dem Puffing, ist er wiederum markiert (Abb. 39 a - c).

Schließlich wurden die Chromosomen IV aus DMSO-behandelten Larven mit reprimierten Balbianiringen 1, 2, 3 (von dem Typus wie in Abb. 36 h sichtbar) nativ isoliert. Die Freisetzung kann Schwierigkeiten bereiten, da die Chromosomen aus DMSO-behandelten Larven auffallend weicher sind, als diejenigen normaler Larven. Diese isolierten Chromosomen IV wurden in einer 3H-UTP-haltigen Salzlösung inkubiert (s. Tab. 10, VII). Bei 340 - 400 mM NaCl verquellen die Chromosomen IV stärker als diejenigen aus nichtbehandelten Larven. Eine Rekondensation (in 0,15 M NaCl) tritt bei den Chromosomen aus 14 Stunden mit 10 % DMSO behandelten Larven nicht ein. Demzufolge wurden die Chromosomen in vitro in maximaler Expansion, d.h. bei einem Durchmesser von ca. 40 µm fixiert. In den Autoradiographien dieser Chromosomen (n=26) erkennt man im BR-Bereich sehr deutlich, jeweils eine schmale "Querscheibe" hoher Markierungsdichte (Abb. 36 i - l), an Stelle der normal in nativ isolierten Chromosomen IV expandierten Balbianiringe (vgl. Abb. 29). Die beiden näher beieinander liegenden "Querscheiben" (in Abb. 29 i - l) dürfen wohl als BR 1 und BR 3 interpretiert werden. Welche Region dem BR 1 und welche dem BR 3 entspricht, ist auf Grund der starken Strukturauflösung jedoch nicht mehr sicher. Andere Orte in den dekondensierten Chromosomen IV zeigen bei verhältnismäßig kurzer Expositionszeit (5 Tage) diese Markierungsdichte nicht. Erst bei längerer xpositionszeit (10 Tage) sind neben stärkerer Streumarkierung zwischen

den Balbianiring-Regionen 1 und 2 - etwa in der Region 2 C - schwächer markierte Abschnitte als die Balbianiringe unterscheidbar (Abb. 36 i).

Zusammenfassend darf gesagt werden, daß die normalerweise im Genom von Chironomus tentans aktivsten Genorte BR 2, 1, 3 in reprimiertem Zustand offensichtlich keinen Einbau zeigen. Erst nach experimentell induzierter Dekondensation in vitro oder bei natürlicher Auflockerung in vivo sind die ringfreien BR 2, 1, 3-Regionen wiederum transkriptionell aktiv.

C DISKUSSION

I Nativ isolierte Riesenchromosomen als Untersuchungsobjekt

Das im deskriptiven Teil der vorliegenden Arbeit angegebene Verfahren erlaubt, polytäne, somatische Interphase-Chromosomen aus larvalen Speicheldrüsenzellen von Chironomus tentans unversehrt zu isolieren und zu analysieren. Aus dem Vergleich mit den cytologischen Verhältnissen in Quetschpräparaten geht allerdings hervor, daß die Architektur der Riesenchromosomen auf Milieufaktoren empfindlich reagiert: Nativ isolierte Riesenchromosomen sind im zellfreien System stärker kondensiert als in vivo. Dies beschreiben unter anderem D'Angelo (1946); Lezzi (1967); Robert (1971); Lezzi und Robert (1972). Auch stimmen in keinem Isolationsmedium für Chironomus-Kerne (s. Ristow und Arends, 1968; Robert, 1971, 1975; Hameister, 1977; Mähr et al., 1977), die Gestalt und Struktur kernverpackter Riesenchromosomen in vitro mit der in situ, d.h. in Speicheldrüsen vorhandenen, ganz überein. Die unter Umständen erheblichen Konformationsänderungen sind in erster Linie Salz-Effekte. Dabei ist weniger dem Anteil monovalenter Ionen (0.13 M KCl oder NaCl), als vielmehr dem Gehalt an bivalenter Kationen die Änderung der Chromosomenstruktur zuzuschreiben. Eine besondere Stellung nehmen Mg^{++}-, Ca^{++}-Ionen ein, welche schon in verhältnismäßig geringer Konzentration (>3 mM) einen höheren Kondensationsgrad polytäner Chromosomen in vitro verursachen, als die auf der Basis der Ionenstärke entsprechende K^{+}- bzw. Na^{+}-Menge. Trotz des offensichtlich ungünstigen Einflusses bivalenter Kationen haben einige Untersucher Riesenchromosomen in vitro noch wesentlich höheren 2^{+}-Konzentrationen ausgesetzt: 40 mM Mg^{++}, Lezzi (1967);

12 mM Mg^{++}, 1.0 mM Ca^{++} (0.15 mM KCl), Lezzi und Gilbert (1970). Robert (1971) verwendet 12 mM Mg^{++} (0.15 mM NaCl); Stein (1976) 10 mM Mg^{++}, 2 mM Mn^{++} (0.1 M KCl) bei der Inkubation polytäner Kerne von Chironomus thummi bzw. Drosophila hydei. Daß 10 - 15 mM Mg^{++} (0.115 M NaCl) bei physiologischem pH (7.0 - 7.3) zu erheblicher Chromosomenverkürzung und -Verhärtung sowie einer Funktionsänderung führen, geht aus dem speziellen Teil der vorliegenden Analyse hervor (Abb. 8, Tab. 2; Abb. 29 d). Die Befunde von Stein (1976), der eine nennenswerte Variabilität der Kernmorphologie im Konzentrationsbereich von (0.1 M KCl) 0.5 - 10 mM Mg^{++} oder Mn^{++} nicht beobachtet hat, konnten für Drosophila hydei und für Chironomus tentans nicht bestätigt werden. Lezzi (1970) beruft sich auf die Untersuchung der Kationenverteilung im Rattenleber-Zellkern von Langendorf, et al. (1961, 1966) und konstatiert, ein verhältnismäßig hoher Mg^{++}-Gehalt (12 mM) sei dem Funktionsmilieu des Zellkernes entsprechend, also physiologisch. Lezzi vernachlässigt, daß die gemessenen Ionengehalte Trockengewichtsbestimmungen sind. Dementsprechend gehen in die Meßdaten Mg^{++}-Ionen ein, welche von verschiedenen Zellkern-Bestandteilen gebunden, dadurch elektrisch neutralisiert und osmotisch inaktiviert sind. Wie die Untersuchungen gezeigt haben, sind für die Wahrung der Chromosomenstruktur (und -Funktion) jedoch nicht die Konzentration bivalenter und monovalenter Ionen im Kern unmittelbar von Bedeutung, sondern die Aktivitäten freier Ionen. Zudem könnte die Kalkulation der Siebertschen Arbeitsgruppe für den Ionenbestand im Zellkern- und Cytoplasma - Wasser, vgl. Siebert und Langendorf (1970), S. 120/121, vielleicht für polytäne Kerne gar nicht gelten. Nach Bestimmungen von Palmer und Civan (1975) besteht in der intrazellulären Verteilung freien Kaliums zwischen Zellkern und Cytoplasma von Chironomus attenuatus (Walker) kein Unterschied.

Kroeger et al., (1973) finden Veränderungen des Ionengehaltes im Kern und Cytoplasma von Chironomus thummi während der Larvenentwicklung. Schließlich wurde für Rattenleber-Zellkerne selbst, die Hyperkondensation aller Chromatin-Strukturen durch bivalente Kationen (12 mM Mg^{++}) elektronenoptisch demonstriert (Kellermayer et al., 1974).

Die in der vorliegenden Untersuchung nach morphologischen Kriterien für optimal befundene $[2^+]$ in den IS-Medien (s. Tab. 1, I - IV) beträgt je 0.5 mM Mg^{++} und Ca^{++}. Lediglich bei der Funktionsanalyse im zellfreien System wurden isolierte Chromosomen mit 2.0 mM Mn^{++} oder 1.0 mM Mg^{++} inkubiert, um die bei dem höheren pH 7.3 (an Stelle von 6.0) eintretende Quellung auszugleichen. Ungeklärt bleibt, ob dieser Konzentrationsbereich (0.5 - 2.0 mM) in etwa den freien 2^+-Aktivitäten in polytänen Kernen von Chironomus tentans entspricht. Widersprechen könnte dieser Annahme die allgemeine Regression der Puffs in vitro. Vielleicht ist der 2^+-Gehalt noch immer zu reichlich. Bereits frühere Experimente von Lezzi (1967); Robert (1971); Gruzdev und Belaja (1968), l.c. Lezzi und Robert (1972); Hameister (1977) liefern Hinweise bezüglich der Empfindlichkeit isolierter Riesenchromosomen gegenüber verschiedenen Ionenspezies, Ionenstärken und verschiedenem pH, sowie der Wechselwirkung letzterer. Aufschlußreich ist womöglich der Vergleich mit anderen, allerdings nichtpolytänen Systemen. So beträgt der Anteil freien Mg^{++} in Erythrozyten unter 1 mM (Rose, 1968). Veloso et al., (1973) ermittelten in Rattengewebe (Leber, Hirn, Milz) eine konstante, freie, intrazelluläre Mg^{++}-Konzentration von etwa 1 mM. Der Gehalt freien Ca^{++} im Cytosol der meisten eukaryotischen Zellen variiert von 10^{-8} - 10^{-5} M (Kretsinger, 1976). Olmsted und Borisy (1975) berichten, daß 1 mM freies Ca^{++} die Polymerisation des Tubulins verhindert und dessen Depolymerisation bewirkt, also in dieser

Konzentration einen inhibitorischen Einfluß entfaltet. Angesichts solcher Befunde ist vermutlich weniger die eingesetzte 2^+, Anlaß überhöhter Kondensation polytäner Chromosomen *in vitro*, als vielmehr der für die Chromosomen-Isolation bevorzugte pH 6.0. Auch Kälteeinfluß als mitbestimmende Ursache *in vitro* ist wahrscheinlich, da 2 - 4°C *in vivo* gleichfalls zu höherem Kondensationsgrad polytäner Chromosomen führen.

Die Argumentation in Richtung einer eher von pH und Temperatur als von dem hier verwendeten 2^+-Anteil abhängigen, chromosomalen Überkondensation wird dadurch gestützt, daß nativ isolierte Riesenchromosomen in Gegenwart von 0.5 - 2.0 mM Mn^{++} oder 0.5 - 1.0 mM Mg^{++} (0.115 M NaCl) im pH-Bereich 6.8 - 7.3 bei 18 -25°C eine den *in situ*-Verhältnissen sehr ähnliche Struktur aufweisen (s. Kap. 1.3., Abb. 6). Puffs sind auch in den bei pH 6.0 isolierten Riesenchromosomen ausgebildet, aber der chromosomalen Überkondensation wegen nicht erkennbar. Gleichzeitig zeigt dieser Befund, daß die experimentell induzierte Überkondensation isolierter Riesenchromosomen - so weit man sehen kann - reversibel ist. Bei anderen Präparationsverfahren, s. Bonner et al., (1968) angewandtes Scheren oder Beschallen nichtpolytänen Chromatins, also weitgehend entspiralisierter Interphase-Chromosomen, verändert dessen Struktur und Funktion: (1) Im Chromatin entstehen zahlreiche Bruchstellen und seine Tertiärstruktur geht verloren (Chalkley und Jensen, 1968; McCarthy et al., 1973; de Pomerai et al., 1974). (2) Gene werden *in vitro* aberrant transkribiert (Honjo und Reeder, 1974; Cedar, 1975; Wilson et al., 1975; Zasloff und Felsenfeld, 1978). (3) Im Fall mit (Micrococcus-) Nuklease präparierten Chromatins stellt sich das Problem, (durch das Enzym) unvermeidbar verursachter Einzelstrang-Brüche und terminalen DNA-Abbaues, vgl. Noll et al., (1975). Es bestehen also erhebliche Zweifel, ob und inwieweit

derartig präpariertes Chromatin die in vivo-Situation tatsächlich widerspiegelt. (4) Isoliertes Chromatin in vitro so zu rekonstituieren, daß es dem nativen Zustand im Kern entspricht, ist bisher unmöglich. Nativ isolierte Riesenchromosomen bieten die vermutlich günstigste Möglichkeit, intaktes genetisches Material in situ zu analysieren und seine Funktion zu prüfen.

II ULTRASTRUKTUR DER RIESENCHROMOSOMEN

1. Banden - Chromomeren

Aus der Zahl von 87 in der vorliegenden Untersuchung bei Chironomus tentans gemessenen Banden und 35 Zwischenbanden ergibt sich eine Variation in der Schichtdicke von 0.09 - 0.63 µm und 0.06 - 0.3 µm für die Zwischenbanden. 0.18 - 0.25 µm breite Banden treten in den Messungen am häufigsten auf. Nach Angaben von Beermann (1972); Berendes et al., (1973); Kiknadze et al., (1976) variieren die Banden von Chironomus, Drosophila und Sciara von 0.05 - 0.3 µm, die Zwischenbanden erreichen bis zu 0.2 µm Dicke. Die für Chironomus tentans in dieser Arbeit ermittelten Messwerte befinden sich also in guter Übereinstimmung mit den frühen Befunden. Abweichungen gibt es lediglich bei der Bestandsaufnahme der Banden im Bereich oberer Werte. Ob es sich bei sehr dicken Banden (lichtmikroskopisch im Bereich 0.5 bis 1 µm, vgl. Beermann 1962, Panitz 1968) um Bandenkomplexe handelt, müßte von Fall zu Fall geprüft

werden. Echte Bandenkomplexe (doublets, triplets) sind in E.M.-Schnittpräparaten manchmal besser, aber manchmal auch schlechter erkennbar als im Lichtmikroskop. Beermann (1952, 1962, 1972) und Sorsa (1969) weisen auf die Artefakt-Natur der sogenannten "capsules" hin, die nur bei der Vorbehandlung mit Ringer-Lösung und anschließender Essigsäurefixierung auftreten. Nach der vollständigen Auflösung der Nukleolensubstanz nativ isolierter Riesenchromosomen bei der Essigsäurefixierung zu urteilen, könnten diese Schnittbilder mit dem Säureeinfluß ursächlich verbunden sein. Weiterhin zeigen gelelektrophoretische und immunhistochemische Befunde, daß das bei lichtoptischen Untersuchungen traditionell angewandte Fixieren mit Alkohol-Eisessig (3:1) von den Chromosomen Histone ablöst (s. Dick und Johns, 1968; Pothier et al., 1975; Silver und Elgin, 1976; Retief und Rüchel, 1977), also wegen der offensichtlichen Artefaktmöglichkeiten nur begrenzt für die submikroskopische Charakterisierung polytäner Chromosomen verwendbar ist. Die besten Fixierungsresultate bezüglich der Strukturerhaltung wurden in der vorliegenden Strukturanalyse allein mit Glutaraldehyd (2 - 6.5 %) erzielt, wobei der Reinheitsgrad bei der Aldehydlösung für die Fixierungsqualität nicht unwesentlich war. Aus der Auswertung ultradünner Schnitte GA-fixierter Chironomus-Chromosomen geht jedoch hervor, daß Durchbrechungen in dicken Banden auch beim Wegbleiben jeglicher Essigsäurebehandlung wiederum vorkommen (s. Abb. 9, 12). Gleiches berichten Kiknadze et al., (1976) für Chironomus thummi. Als Erklärung für das Vorhandensein von Spalträumen auch in GA-fixierten Banden kommt die Möglichkeit, an die man zuerst denkt, in Betracht, daß 0.3 - 0.63 µm dicke Banden natürlich vorhandene Doppelbanden bzw. Bandenkomplexe darstellen (vgl. auch Beermann, 1962). Deren Zwischenbanden treten lediglich weniger deutlich als bei Alkohol-Eisessig fixierten, stark überdehnten Riesenchromosomen, wie sie Sorsa und Sorsa (1967), Sorsa

(1969, 1973) gewöhnlich präparieren, in Erscheinung. Als weiteres Argument für die gelegentliche Bandenanhäufung kann der Befund gelten, daß die Dicken einzelner Banden in den durchbrochenen 0.4 - 0.63 µm breiten Regionen bei Chironomus tentans - nach Kiknadze et al., (1976) gilt das auch für Chironomus thummi - 0.25 - 0.3 µm nicht überschreiten und die zuletzt genannten Bandendicken am häufigsten in Speicheldrüsenchromosomen dieser Chironomiden meßbar sind. Daß bei Anwendung der Alkohol-Eisessig-Fixierung, Lücken im Bandenbereich zu Kavernen oder den "capsules" vergrößert werden, ist freilich nicht auszuschließen.

Bei Betrachtung von Ultradünnschnitten polytäner Chromosomen, etwa von dem Typus wie in Abb. (9), entsteht durchweg der Eindruck, daß Banden strukturlose Chromosomenregionen darstellen. Die Negativ-Darstellung GA-fixierter Dünnschnitte erlaubt den fibrillär zusammengesetzten Bau der Banden so anschaulich darzustellen, daß elementare Fibrillen, d.h. Einzelchromosomen bzw. Chromatiden im Bandeninnern verhältnismäßig gut voneinander abgegrenzt und scharf gekennzeichnet zu lokalisieren sind. Solche Bilder (s. Abb. 11b, 12, 13) und die modellmäßige Wiedergabe in Abb. (18) machen sichtbar, daß das einzelne Chromomer, als kleinste Struktureinheit polytäner Chromosomen, durch die differentielle Knäuelung der Chromatide im Bandenbereich entsteht , während die Chromatiden in den Zwischenbanden nicht so eng oder überhaupt nicht gepaart sind und sich in relativ gestreckter Konformation befinden. Solche Bilder bestätigen die zuerst von Ris und Crouse (1945), später auch von anderen (z. B. Beermann, 1959) vertretene Hypothese des Chromomeren-Baues.

Daß eine Proportionalität zwischen der Schichtdicke, der DNA-Menge, der vermutlichen Anordnung und der Fibrillenanschnitte besteht, geht aus den als Negativ wiedergegebenen Ultradünnschnitten ziemlich deutlich hervor.

Diese Proportionalität ist erwartungsgemäß. Da die Banden und Interbanden trotz sehr unterschiedlichen DNA-Gehaltes nicht unähnlich sind (s.o.), so muß eine veränderte DNP-Packung - entweder in Form lokal vermehrter Knäuelung oder durch Dickenzunahme der Fibrillen - in den Banden vorliegen. Dicke Banden, also Regionen hohen DNA-Gehaltes, müssen offensichtlich stets mehr abgefaltete Chromatidensegmente enthalten, als dünnere Banden. Die Interbanden zeigen keine vergleichbare Chromatidenknäuelung, also eine deutlich geringere DNA-Konzentration. Der Fibrillendurchmesser (110 - 130 A) verändert sich allerdings in keinem Chromosomenabschnitt, d.h. variierende DNA-Mengen werden mittels örtlich begrenzter, mehr oder weniger umfangreicher Chromatiden-Knäuelung verteilt. Intrafibrilläre Faltungen zu dickeren Fibrillen, also differentielle Packungsstufen gibt es in polytänen, somatischen Interphasechromosomen nicht. Packungsunterschiede kommen vor. Vgl. auch Punkt 2 der Diskussion.

Charakteristische Differenzierungen einzelner Fibrillen, welche zu einer Musterausprägung innerhalb der Banden führen könnten, sind in derartigen Ultradünnschnitten leider nicht deutlich sichtbar. Gelegentlich entsteht zwar der Eindruck einer schleifenförmigen Aufschraubung einzelner DNP-Fibrillen, die aus mechanischen und energetischen Gründen sinnvoll erscheint. Jedoch ist anhand der gleichen Bilder eine einfachere Faltungstendenz, etwa von dem Modus, wie ihn DuPraw und Rae (1966); DuPraw (1970) in dem "folded fiber model" vorschlagen - die man auf Grund der schon lichtoptisch sichtbaren Torsion oligotäner Fibrillen freilich nicht erwartet - nicht auszuschließen. Zusätzlich erschweren die gegenseitige Überlagerung und enge Nachbarschaft, also die hohe Packungsdichte elementarer Fibrillen, die vermutete, geordnete Grundstruktur aufzulösen. Dieses ungeordnete Arrangement der Chromatiden, wie es sich in 400 -

800 A dicken Schnitten von Speicheldrüsen-Chromosomen manifestiert, ist nicht nur auf Chironomus tentans beschränkt. Ähnliche Bilder finden sich bei Drosophila (Sorsa, 1973), bei Sciara (Gabrusewycz-Garcia und Garcia, 1974) und sind selbst in Chromomeren der Lampenbürstenchromosomen (4C) von Triturus cristatus anzutreffen (Mott und Callan, 1975). Diese Übereinstimmungen sprechen dafür, daß somatische, polytäne Interphase-Chromosomen und meiotische Lampenbürsten-Chromosomen in ihrem Chromomerenbau einander ähnlich sind.

Mit der Spreitung nativ isolierter Riesenchromosomen ist die Entfaltung der Banden verknüpft. In Spreitungspräparaten findet man im Chromatidenverlauf, in Abständen von 0.6 - 3 µm eingeschaltete Schleifen verschiedenen Entfaltungsgrades (Abb. 16, 17). Diese Schleifenkonfigurationen könnten Übergangsformen zwischen im Leben eng gefalteten Chromomeren-Fibrillen und solchen, wie in den Balbianiringen und anderen Puffs sichtbaren, in vivo entstandenen Schleifen darstellen. Andererseits könnte es sich um Transkripte handeln. Zunächst wäre demnach (1) das Für und Wider der Chromomeren - bzw. die hypothetische Transkript-Natur dieser intermittierend angeordneten Knäuel zu diskutieren, und (2) worin der Anlaß der Kondensation der meisten Chironomus-Chromomeren zu suchen sein könnte. In elektronenoptischen Bildern gespreiteter, ribosomaler und nichtribosomaler Transkriptionseinheiten (s. Miller und Beatty, 1969; Meyer und Hennig, 1973; Glätzer, 1975) beobachtet man in der Regel eine unidirektionale Längenzunahme der lateralen Fibrillen, unabhängig vom jeweiligen Abstand letzterer zueinander. Demgegenüber zeigen Chromomeren-Fibrillen keinen Längengradienten; große und kleine Schleifen treten benachbart auf. Während Transkripte ein einzelnes, freies Ende zeigen, fehlt dieses in der Regel allem Chromomeren-Fibrillen. Letztere bilden, außer

in den Fällen, wo sie durch den Spreitungsprozeß geschädigt werden, indem sie zerreißen oder von der Axial-, also der Interbanden-Fibrille abreißen, stets mehr oder weniger entfaltete Schleifenformen. Ein weiteres Argument gegen die Transkript-Natur, ist das Vorhandensein von zwei Insertionsstellen bei den Chromomeren-Schleifen, die den RNP-Fibrillen fehlen. Im Falle einer simplen, zweifachen Überlappung einzelner Chromatiden durch Transkripte, dürfte keine Unterbrechung in der Kontinuität der Chromatiden sichtbar sein. Zu den bisher genannten Unterschieden kommt der Befund, daß mittels Pronase-DNase-Einwirkung die Chromomeren-Fibrillen in gleicher Weise wie die Zwischenbanden-Fibrillen abbaubar sind, wohingegen die Ribonuklease-Verdauung zu keinem entsprechenden Ergebnis führt. Auf Grund von alle dem wird die Transkript-Natur ausgeschlossen.

Nun könnte der Verdacht bestehen, daß spreitungsbedingte, mehr oder weniger zufällig entstandene Chromatin-Schleifen Chromomeren vortäuschen. Eine Möglichkeit, diesen Einwand zu entkräften, sollte unter anderem die Bestimmung des Schleifen-DNA-Gehaltes und der Vergleich mit anderen experimentellen Daten liefern. Die Wahl des einzurechnenden Verkürzungsfaktors bzw. das Packungsverhältnis, d.h. wie sich die Länge entspannter, ausgedehnter DNA zu derjenigen in DNP-Fibrillen vorhandenen verhält, ist ein kritisches Moment. Befunden verschiedener Arbeitsgruppen (s. Olins und Olins, 1974; Woodcock, 1973) und anderen zufolge, ist Chromatin perlschnurartig aus Nukleosomen aufgebaut, wobei das Packungsverhältnis der 200 Nukleotidpaare in der ca. 100 A dicken, individuellen Struktureinheit 7:1 beträgt (Finch et al., 1975). Von der Ionenstärke (0.15 und 0.015 M) abhängige Verschiebungen im Packungsverhältnis von 7:1 nach 3:1 kommen vor (Griffith, 1975). Auf wässeriger Hypophase (pH 7 - 8.5), also gleichfalls in sehr niedriger Ionenstärke (ca. 10^{-4} M) gespreitete und

entfaltete Chironomus-Chromomeren verlieren ihre ursprünglich ausgeprägte Nukleosomenstruktur deshalb rasch (vgl. Abb. 15 b und Abb. 17). Demnach ist die DNA in dieser Situation ebenfalls stark entspannt und nicht im Verhältnis 7:1 verkürzt. Nach Röntgenbeugungsbefunden von Pardon et al., (1967); Pardon et al., (1973) an gleichfalls in Wasser befindlichem Chromatin, ist die DNA in der 110 A-Fibrille im Verhältnis 2.6:1 verpackt. Nach Befunden von Bram und Ris (1971) errechnet sich ein Verkürzungsfaktor von 3-4:1, vgl. Comings und Okada (1973). Auf Grund des Obengesagten ist die Annahme einer DNA-Verkürzung von 3:1 in den Wasser-gespreiteten Chromomeren vertretbar. Demnach beträgt die DNA-Länge in den 0.8 - 8.4 µm langen Chromomeren von Chironomus tentans 2.4 - 25.2 µm. Vorausgesetzt, daß 1 µm DNA 3 000 Basenpaaren entspricht, so variiert der Anteil letzterer in den Schleifen von 7 200 - 75 000 bzw. beträgt 7.2 - 75 Kilobasen (KB). Das Vorkommen noch kleinerer sowie größerer Schleifen ist nicht auszuschließen. Auch ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß bei hoher Spreitungsintensität Schleifen künstlich vergrößert werden, indem Abschnitte der Interbanden-Fibrille in den Schleifenkomplex eingehen. Andererseits könnten Schleifen bei zu hohen Zugkräften auseinandergezogen, dadurch teilweise linearisiert werden und größere Abstände vortäuschen.

Dividiert man die DNA-Menge des haploiden Genoms von Chironomus tentans (i.e. 20 Picogramm, Daneholt und Edström, 1967) durch die 1 900 Banden (Beermann, 1952), so errechnet sich ein Durchschnittswert von 100 KB pro Chromomer (Edström, 1974). Dieser Wert liegt allerdings 25 KB über dem DNA-Gehalt der längsten, gespreiteten Schleife (75 KB). Als Ursache der Zahlenunterschiede ist einerseits anzunehmen, daß der von Edström der Rechnung zugrunde gelegte Polytäniegrad unzutreffend sein könnte und an-

dererseits, daß die lichtoptisch bestimmte Bandenanzahl nur als Näherungswert aufzufassen ist, also beide Größen Unsicherheitsfaktoren beinhalten. Selbst wenn Chromomeren über 75 KB tatsächlich vorkommen, aber in Spreitungen nicht erfaßt wurden, so spricht das vermehrte Vorhandensein kleinerer Chromomeren-Konfigurationen in den EM-Präparaten gegen einen durchschnittlichen DNA-Gehalt von 100 KB pro Chromomer. Wahrscheinlich ist es angemessener, die von Edström (1974) geltend gemachte DNA-Menge als oberen Wert und 50 - 70 KB als Durchschnittswert anzusehen. Zwar könnte die von Wolstenhome et al., (1968) aus Kernen isolierten DNA-Fragmente von durchschnittlich 47 µm Konturlänge, bzw. 111 KB, Edströms Deutung zunächst stützen, da sich, wie erwähnt, höchstens 5 % der DNA in Interbanden befinden. Es ist jedoch, z.B. mittels in situ-Hybridisierung, noch nicht entschieden und durchaus denkbar, daß in solchen DNA-Abschnitten zwei oder mehrere Chromomeren mit interkalierten Zwischenbanden vorliegen.

Wichtige Stützen für das hier vorgestellte Chromomeren-Modell (Abb. 18), stellen auch die Arbeiten von Sorsa (1973) und Benyajati und Worcel (1976) dar. Obwohl die von Sorsa bei Drosophila melanogaster angewandte Präparationsmethode (10 M Harnstoff und 0.5 M NaOH, 1:1) äußerst drastisch und demzufolge die Fehlermöglichkeiten durch Artefaktbildungen besonders hoch sind, vermitteln die EM-Bilder gleichfalls den Eindruck einer Schleifenstruktur des Chromomers. Die von Sorsa beobachteten "ringlets" hingegen sind wahrscheinlich abgespulte, durch Enden-Kontakt zu Ringen geschlossene Überbleibsel, der bei Chironomus tentans bei Spreitungen auf destilliertem Wasser meistens noch vorhandenen Schraubung der Chromomeren-Fibrillen. Nahezu übereinstimmend mit der Bandenzahl in Polytänchromosomen fand Keyl (1975) in Chironomus pallidivittatus-Spermatocyten 1400

Lampenbürstenschleifen.

Die biochemische Parallele zu den vorliegenden Spreitungsbefunden mit nativ isolierten Chironomus-Chromosomen stellt die Arbeit von Benyajati und Worcel (1976) dar. Diesen Autoren gelang es, "Drosophila folded DNA loops" von 5 000 S zu isolieren. Ebenso wie im Fall gespreiteter Chironomus-Chromomeren gibt es in intakten Drosophila-Chromosomen gefaltete, kondensierte Chromomeren-Schleifen mit negativ orientierten Helix-Windungen. Auch diese sind in situ unfähig, die windungsbedingte Spannung von selbst auszugleichen, indem sie frei rotieren. Setzt man bei Chironomus- und Drosophila-Schleifen mittels DNase, also enzymatisch, Bruchstellen, so kommt es in beiden Fällen unmittelbar zur Entfaltung bzw. Fragmentierung der Chromomeren.

Es bleibt noch zu erörtern, was die Chromomeren in vivo kondensiert erhält. In Spreitungspräparaten fiel immer wieder der unterschiedliche Erhaltungszustand von Chromomeren-Fibrillen im Vergleich zu den Interbanden-Fibrillen ins Auge. Die Ursache könnte der selektive Verlust von Proteinen, RNA oder RNP sein. Wie die Kontrastminderung der Fibrillen nach RNase-Behandlung zeigt, liegt auf jeden Fall ein RNA-Verlust vor. Isolierte "Drosophila folded DNA loops" sind gleichfalls mit RNA assoziiert (Benyajati und Worcel, 1976). Um was für eine RNA-Fraktion es sich handelt, ob um Chromomeren-spezifische Transkripte (HnRNA) und/oder cRNA (Huang und Bonner, 1965; Holmes et al., 1972) ist unklar.

Es gibt verschiedene Gründe auch Protein-DNA-Interaktionen für die Schleifenbildung und den Kondensationszustand des Chromomers verantwortlich zu machen. Deutlich höhere Kondensation zeigen Chromosomen nach Zugabe von Histon (f1) H 1 (Mirsky et al., 1968). Da andererseits Histon H 1 in hypotonischen Medien bekanntlich dissoziiert (Bradbury et al., 1975), quel-

len nativ isolierte Chironomus-Chromosomen auf und werden Chromomeren unterschiedlichen Entfaltungsgrades in EM-Präparaten sichtbar. Kommt den Histonen H 3, H 4, H 2A und H 2B eine essentielle Rolle bei der DNA-Abfaltung in individuelle Struktureinheiten (Nukleosomen), also im Kleinen zu, so sind vermutlich Histon H 1 als Verpackungsprotein und Nicht-Histone für die Stabilität und Faltung ganzer Chromomeren-Schleifen, also im Großen, verantwortlich.

Stabilisierende Funktionen der Nicht-Histone werden dadurch dokumentiert, daß die strukturelle Integrität der Chromomeren-Schleifen selbst dann noch besteht, wenn alle Histone und die meisten Nicht-Histone der Chromomeren entfernt werden (s. auch Benyajati und Worcel, 1976), und daß der proteolytische Abbau unmittelbar zur vollständigen Despiralisierung aller Chironomus-Schleifen führt. Mit Sicherheit gehört RNA-Polymerase B (II) als Nicht-Histon zur Proteinbelegung der Chromatiden, wie aus autoradiographischen Befunden mit nativen IS-Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans hervorgeht (s. Kap. 3 und Punkt IV der Diskussion). Derartige Befunde und die Immunfluoreszens-Befunde von Jamrich et al., (1977) könnten erklären, weshalb in gespreiteten Chironomus-Chromatiden in mehr oder weniger unregelmäßigen Abständen, jedenfalls nicht in Nukleosomendichte ca. 100 - 130 A dicke, globuläre Partikel, vermutlich die im arbeitenden Zellkern stilliegenden B-Polymerasen, lokalisierbar sind. Transkriptionell tätige und untätige RNA-Polymerasen wurden sogar in Replikationsgabeln von Drosophila melanogaster nachgewiesen (McKnight und Miller, 1977). Wenn kondensierte Banden polytäner Chromosomen bei Antigen-Antikörper Reaktionen keine Fluoreszenz zeigen, muß das nicht bedeuten - wie Jamrich et al., (1977 a, b) vermuten - daß B-Polymerasen dort fehlen. Möglicherweise sind B-Polymerasen (in Quetschpräparaten) für

Immunglobuline in stark kondensierten Banden deshalb nicht erkennbar, weil andere Proteine die B-Polymerasen maskieren. Oder der bandenspezifische Kondensationszustand inhibiert jedwede Antigen-Antikörper-Reaktion.

2. Die Elementarfibrille

Ultradünnschnitt-Analysen polytäner Chromosomen (Beermann und Bahr, 1954; Kalnins et al., 1954; Lowman, 1956; Gay, 1956; Kaufman und McDonald, 1956; Yazusumi, 1957; Sorsa und Sorsa, 1967; Berendes, 1970; Kiknadze et al., 1975 und anderen) haben die Gültigkeit der Polytänie-Hypothese von Koltzoff (1934) auch elektronenoptisch demonstriert. Unmöglich war es allerdings bisher, ein klares Bild von der Bandeninnenstruktur zu gewinnen, weshalb die Beschreibung 100-500 A breiter Fibrillen sich in der Regel auf die in den Zwischenbanden sichtbaren Fibrillen bezieht. Die Frage, ob der Fibrillendurchmesser wegen des unterschiedlichen DNA-Gehaltes in den Quer- und Zwischenbanden variiert, kann man als beantwortet ansehen: In Ultradünnschnitten der Banden, Zwischenbanden, sowie Puffs und Nukleolen von Chironomus, beherrscht die 110-130 A-Fibrille das Bild. Eine Unterteilung der 110-130 A-Fibrille in zwei 50-60 A breite Subfibrillen (Sorsa und Sorsa, 1967; Berendes, 1970) hat sich im Fall von Chironomus tentans nicht bestätigt. Andererseits wurde behauptet (Berendes und Meyer, 1968), Fibrillen von 100 -125, 200-250 und 400 A Durchmesser kämen bei Drosophila hydei vor. 400 A-Fibrillen sollten sich nach Meinung der Autoren in zwei 200 A-Fibrillen und die 200-250 A-Fibrillen in zwei Fibrillen von je 100-125 A Durchmesser aufspalten. Örtlich variierende Fibrillendicken wurden zuweilen auch bei Chironomus beobachtet. Die sorgfältige

Analyse ergibt aber immer, daß es sich in solchen Fällen um Aggregationen und/oder Überlappungen 110 - 130 A messender Fibrillen handelt, was dickere Fibrillen vortäuschte.

Wie die Untersuchungen gezeigt haben, ist der Durchmesser gespreiteter Chromatiden sehr variabel, wobei die 200 - 250 A-Fibrille (s. auch Rae, 1966) vorherrscht. Ansonsten sind gespreitete Chromatiden - aber nur bei ausreichend schneller Präparation - immer mit Nukleosomen besetzt (Abb. 15), in Ultradünnschnitten unter physiologischen Salzbedingungen nicht. Die Nukleosomen in Spreitungspräparaten von Chironomus ähneln morphologisch denen von Olins und Olins (1973); Finch, Noll und Kornberg (1975) und anderen mittels Spreitung dargestellten.

Das Vorkommen verschiedener Fibrillendurchmesser in Schnitt- und Spreitungspräparaten wirft noch einmal die Frage auf (s. Ris, 1969; Wolfe, 1969; Ris und Kubai, 1970; Huberman, 1973; Ris, 1975), ob die 110 - 130 A- oder die 200 - 250 A-Fibrille die elementare Chromosomenfibrille repräsentieren. Entweder besteht die dicke Fibrille aus zwei Seite an Seite liegenden, individuellen 110 A-Fibrillen (Ris, 1969), die durch Histon H 1 vernetzt werden. Oder intrafibrilläre Rückfaltungen bzw. das supercoiling (DuPraw, 1969; Pardon und Wilkins, 1971; Lampert, 1971) der 110 A-Fibrille führen zunächst zu 200 - 250 A-Fibrillen, welche dann sekundär durch Histon H 1 vernetzt werden. Der Möglichkeit, daß zwei individuelle 110 - 130 A-Fibrillen die dicke Fibrille bilden, widerspricht die Beobachtung, daß gespreitete Chironomus-Chromatiden nach Pronase-Abbau Uninemie erkennen lassen. Was die hypothetische Schraubung bzw. Rückfaltung der 110 A-Fibrille zur dicken Fibrille, also die intrafibrillär höhere Packung angeht, so sollen für deren Existenz und Stabilität bivalente Kationen essentiell sein (Ris, 1966). Oder Histon H 1 bindet an die 110 A-

Fibrille und verknäuelt sie sekundär zur dicken 200 - 300 A-Fibrille (Renz et al., 1977; Worcel und Benyajati, 1977). Demgegenüber beobachten Zirkin und Wolfe (1972); Heumann (1974) und andere keine Änderung des Fibrillendurchmessers in Gegenwart chelatisierender Agentien. Röntgenbeugungsstudien lassen keine unterschiedliche Reflektion in dicken und dünnen Fibrillen erkennen, weshalb Pooley et al., (1973) höhere DNA-Packungsstufen in der 200 - 300 A-Fibrille ausschließen. Ob also das veränderte Ionenmilieu im Spreitungsmedium und dadurch induzierte Ladungsveränderungen die vermutete Schraubung der 110 - 130 A-Fibrille beeinflussen oder ob Substanzverluste bzw. Umverteilungen zu dicken Chironomus-Chromatiden in Spreitungspräparaten führen, bleibt offen. Es sieht so aus, als ob die in Ultradünnschnitten typischen 110 - 130 A-Fibrillen (beim Spreiten) im hypotonischen Milieu eine oder mehrere Strukturkomponenten (vor allem Histon H 1) teilweise oder vollkommen verlieren, die für den Kondensationsgrad der 110 - 130 A-Fibrille essentiell sind.
Den vielleicht überzeugendsten Beleg dafür, daß 200 - 250 A-Fibrillen aus dünnen Fibrillen entstehen, zeigen Wolfe und Grim (1967) am Beispiel gespreiteter Triturus-Erythrozyten-Kerne: Im Moment des Zusammenbrechens der Kernhülle nehmen alle intranuklearen 110 A-Fibrillen im kernfreien Bereich an Dicke zu, sodaß - analog zu gespreiteten Chironomus-Chromatiden - nun Übergänge im Fibrillenverlauf von 110 - 250 A messbar sind (vgl. Wolfe und Grim, Abb. 7 und 8). Mit PO_4-gepuffertem Formaldehyd vorfixierte Fibrillen zeigen auch nach ihrer Spreitung noch immer 120 - 140 A-Durchmesser (Wolfe, 1968).

Im Gegensatz zu Spreitungen erlaubt die Ultradünnschnittanalyse, im physiologischen Milieu der Speicheldrüse fixierte Chromosomen zu untersuchen. Dieses empfindlichere Kriterium, sowie die Tatsache, daß mittels Glutar-

aldehyd in chelatisierendem Phosphat- oder nichtchelatisierenden PIPES-Puffer fixierte Chromosomen in den Banden, Zwischenbanden, Puffs und Nukleolen 110 - 130 A-dicke Fibrillen aufweisen, legt nahe, letztere als elementare Chromosomenfibrille anzusehen. 110 - 130 A-Fibrillen sind nicht nur für Euchromatin charakteristisch. Das voluminöse Kinetochoren-Heterochromatin von Chironomus melanotus zeigt in Schnitten ebenfalls einen klar erkennbaren Aufbau aus diesen Fibrillen (Sass-unveröffentlicht).

3. Die Balbianiringe als Puffs

Die klassische, elektronenoptische Untersuchung der BR-Feinstruktur von Beermann und Bahr (1954) ließ zum ersten Male in Dünnschnitten die spezifische BR-Struktur (BR 1 und BR 2), bestehend aus Chromatinschleifen, besetzt mit 300 - 500 A dicken Ribonukleoprotein-Grana erkennen (vgl. auch Stevens und Swift, 1966). Aussagen über die Granaanzahl pro Längeneinheit auf dem Template oder einen Längengradienten der Syntheseprodukte sind aus Schnitten, jedoch nur schwierig abzuleiten. Erst die Spreitung von nativ isolierten Chromosomen IV von Chironomus tentans sollte eine genauere Analyse der Transkriptionselemente erlauben. Die Interpretation der Befunde geht davon aus, daß die mittels hypotonischer Chromatindispersion dargestellten RNP-Grana mit denen in Ultradünnschnitten des BR 2 identisch sind. In beiden Fällen zeigt sich eine weitgehende Übereinstimmung in Morphologie und Dimension. Für BR 1, der allerdings in der Regel kleiner ist, gilt das gleiche. Dem BR 3 und anderen Puffs im Chromosom IV fehlen die für BR 1 und BR 2 lokusspezifischen 300 - 500 A dicken RNP-Grana. 130 - 200 A messen BR 3-RNP-Grana (im Dünnschnitt, Abb. 31g).

Es besteht wohl kein Zweifel, daß die Spreitungsbilder Abschnitte von Transkriptionseinheiten zeigen: Der Achsenfaden ist das Template (DNP), während die gestielten, globulären Elemente das kondensierte Transkript (RNP) darstellen. Dieser Befund deutet zunächst auf eine prinzipielle Ähnlichkeit im Aufbau ribosomaler (s. Miller und Beatty, 1969) und nichtribosomaler Transkriptionselemente. In Spreitungspräparaten von Chironomus sind die Granastiele gelegentlich nicht zu erkennen. Dies mag ein Spreitungsartefakt sein. Während rRNA-Cistrons jeweils eine Population von RNP-Fibrillen tragen, deren unidirektionale Längenzunahme den Syntheseverlauf andeutet, ist in den gespreiteten BR-Schleifen über kurze Abschnitte von 1 µm Länge hinweg, kein Größengradient zu erkennen. Abschnitte solcher Länge zeigen auch keinen deutlichen Unterschied in Granadurchmesser (Abb. 21b). Diese Tatsache ist mit der Annahme des Vorhandenseins verhältnismäßig kurzer (< 2 µm) Transkriptionseinheiten im BR 2 (und BR 1) nicht vereinbar. Ob die auf 1 µm langen Abschnitte nahezu gleich großen BR 2-Grana dennoch unterschiedlich lange RNP-Fibrillen enthalten können, bleibt offen.

Auch die beträchtliche Größenheterogenität der BR 2-(BR 1-)Grana in Übersichtspräparaten (i.e. 300 - 500 Å) weist in die Richtung einer langen Transkriptionseinheit im BR 2-Chromomer. Vergleichsweise zeigen die ca. 2.2 µm langen rRNA-Cistrons von Chironomus thummi (Derksen et al., 1973) im Dünnschnitt lediglich 150 - 200 Å dicke RNP-Grana. Für die Existenz einer langen Transkriptionseinheit im BR 2 spricht auch das Schnittbild der BR 2- und BR 1-Regionen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelter Larven. Hier findet man 3 - 6 µm lange, schleifenartige Kondensate, die von 300 Å-RNP-Grana umgeben sind (Abb. 35 b). Sie entstehen vermutlich dadurch, daß der Verpackungsmechanismus langsamer arbeitet (vgl. die Disk.

der DMSO-Exp.). Biochemische Befunde lassen ebenfalls ein größeres BR 2-Transkript vermuten: Annähernd 1.5 % cytoplasmatischer Speicheldrüsen-RNA wandert im Gel in die 75 S-Region und ist komplementär zu BR 2 und BR 1 (Daneholt und Hosick, 1973).

Bekanntlich kommen bei rRNA-Cistrons (s. Meyer und Hennig, 1972) und den Histon-Genen von Drosophila (Pardue et al., 1972; Birnstiel et al., 1973) nicht transkribierte Spacer zwischen den tandemartig angeordneten Cistrons vor. Auch in BR 2-Spreitungspräparaten wurden Abschnitte völlig frei von Transkriptionsprodukten beobachtet. Solche RNP-freien Lücken treten allerdings unregelmäßig auf und variieren längenmäßig von 0.12 - 0.34 µm. Hierbei handelt es sich wohl um Spreitungsartefakte. Vermutlich entstehen RNP-freie Lücken durch das Abreißen bzw. Abstreifen von Grana beim Spreiten. Mit dieser Annahme wäre auch verständlich und der Befund in Einklang, daß den Lücken beiderseits benachbarte RNP-Grana sich in der Größe nicht voneinander unterscheiden. Im Fall mehrerer, hintereinander geschalteter Transkriptionseinheiten sollten deutliche Unterschiede in der Granagröße vorhanden sein. Charakteristische Spacer, die ein tandemartiges Arrangement identischer, multipler Cistrons sichtbar dokumentieren, fehlen anscheinend im BR 2. Diese und die erwähnten DMSO-Befunde zusammen legen den Schluß nahe, daß im BR 2 eine solitäre Transkriptionseinheit von 3 - 6 µm Länge existiert. Allerdings ist es des komplizierten Chromosomenbaues und der folglich schlechten Spreitbarkeit wegen bisher noch nicht gelungen, BR 2 als vollständige Transkriptionseinheit darzustellen. Demzufolge ist das Vorhandensein mehrerer, sich wiederholender Transkriptionseinheiten im BR 2 nicht völlig auszuschließen.
Vorausgesetzt die BR 2-DNA befindet sich in der B-Konformation und ist ähnlich wie rRNA ca. 10 % verkürzt (Meyer und Hennig, 1973), so besteht

die DNA der BR 2-Transkriptionseinheit aus etwa 20 000 Basenpaaren.

Nichtnukleoläre, solitäre Transkriptionseinheiten von 2 - 8 µm Länge wurden inzwischen auch bei Drosophila melanogaster (McKnight und Miller, 1976; Laird und Chooi, 1976) und Oncopeltus fasciatus (Foe et al., 1976) durch Spreitung analysiert. Lange Transkriptionseinheiten scheinen im Gegensatz zur hohen Redundanz ribosomaler Cistrons im Fall mRNA-codierender Gene die Regel zu sein. Hybridisierungsexperimenten zufolge kommen lediglich 1 - 2 Kopien des BR 2-Gens im haploiden Genom von Chironomus tentans vor (Hollenberg, 1976). Da 0.17 % der Speicheldrüsen-DNA zu BR 2-RNA komplementär ist (Lambert, 1972), so könnte eine interne Sequenzredundanz in der BR 2-RNA vorliegen. Das wäre keine Ausnahmesituation. Typische Struktur- bzw. Faserproteine, wie Keratine, Kollagene und die Proteinklasse der Seiden und Insektenfäden sind aus einfachen und sich stets wiederholenden Elementen aufgebaut (s. Ycas, (1972); Grossbach, 1969, 1973)).

Wie erwähnt, besitzen nur BR 2 und BR 1 im Normalfall stets mehr und grössere RNP-Grana, als gewöhnliche Puffs. BR 2 enthält 75 mal mehr RNA als ein durchschnittlicher Nicht-BR-Puff (Edström et al., 1978). Worauf diese Differenz im RNA-Gehalt zurückgeht, war bisher nicht ganz verständlich. Die Ursache kann auf einer (1) unterschiedlichen Templatelänge, (2) auf einer unterschiedlichen Größe und Menge nascenter RNA pro Längeneinheit und/oder (3) auf einer veränderten Polymerasendichte beruhen. Die Verteilung der B(II)-Polymerasen ist unter anderem also auch aus dem Grunde interessant, ob irgendein Zusammenhang zwischen der Puffgrösse und zunehmender Polymerasendichte besteht.

BR 2-Grana kommen in Spreitungspräparaten in ca. 300 - 1000 A Abstand vor. Legt man zunächst den oberen Abstandswert als den, den in vivo-

Verhältnissen eventuell entsprechenden zugrunde, so errechnet sich - ausgehend von der Annahme jedes BR-Granum ist das Produkt der Aktivität einer B-Polymerase - eine Dichte von 10 Polymerasen pro 1 µm Templatelänge. Solche Granaabstände von 1000 A stimmen auf den ersten Blick ziemlich gut mit der Hypothese überein, die besagt, 30 µm BR 2-Template enthalten 120 B-Polymerasen pro Strang (s. Pelling, 1972), also in 2500 A Entfernung voneinander. Desgleichen steht dieser Spreitungsbefund nicht in unvereinbarem Widerspruch mit der von Daneholt (1975) gemachten Annahme, allenfalls 3 - 7 nascente RNP-Fibrillen seien (in Abständen von 3300-1400 A) auf 1 µm BR 2-Template verteilt. Neben diesen theoretischen Erwägungen könnte sich im übrigen eine experimentelle Bestätigung aus Spreitungsanalysen embryonalen Gewebes von Drosophila melanogaster ergeben. McKnight und Miller (1976) zufolge, besitzen nichtnukleoläre, solitäre Transkriptionseinheiten von 3 - 8 µm Länge, gewöhnlich zwischen 10 - 20 B(II)-Polymerasen (in Abständen von 1000 - 500 A) bzw. durchschnittlich 6 RNP-Fibrillen (Laird und Chooi, 1976) in 1700 A Distanz pro 1 um DNP-Template. Das machte zunächst glauben, 1000 A sei auch der natürliche Polymerasenabstand im BR 2 (und BR 1).

Im Fall ca. 300 A voneinander getrennter BR 2-Grana besetzen etwa 33 B-Polymerasen, also die mehr als dreifache Anzahl, 1 µm BR 2-DNA. Diese Variabilität im Granaabstand ist für die Entscheidung der Frage nach der wirklichen Polymerasendichte im BR 2 erschwerend. Aus dem Vergleich zwischen den durch Oberflächenspreitung und denjenigen durch Mikrozentrifugation zerteilten BR 2 geht allerdings hervor, daß verhältnismäßig große Grana-freie Abstände von 1000 A und mehr, nur in Präparaten oberflächengespreiteter Balbianiringe vorliegen. Demzufolge können BR 2-Grana während der Oberflächenspreitung vom Template "abfallen", was in

Anbetracht der drastischen, unkontrollierbaren Grenzflächenkräfte nicht abwegig scheint. Weite Granaabstände können schließlich nicht anders als in diesem Sinne gedeutet werden, da (als stärkeres Argument dafür) 300 - 500 A voneinander benachbarte BR-Grana - so weit man sehen kann - durch Stiele mit dem BR 2-Achsenfaden verbunden sind. Ein Spreitungsartefakt, denkbar wäre eine Granaaggregation am Template, ist demnach auszuschließen. Nach alle dem unterscheiden sich BR 2 (und BR 1, 6 vermutlich ebenso) lediglich durch eine größere Länge und geringfügig aufgelockerte B-Polymerasenbesetzung von einem ribosomalen Gen. Nimmt man eine Wachstumsrate von 50 Nukleotiden pro Sekunde pro B-Polymerase für die aus ca. 20 000 Basenpaaren (s.o.) aufgebaute BR 2-Transkriptionseinheit an, so sollte das Gen in ca. 7 Minuten transkribiert sein.
Ähnliche Polymerasendichten nichtnukleolärer Transkriptionseinheiten wurden für meiotische Lampenbürstenchromosomen von Triturus (Miller und Beatty, 1969); Acetabularia (Spring et al., 1974; Scheer et al., 1976); Pleurodeles (Angelier und Lacroix, 1975) demonstriert. Man findet sie desgleichen im Fibroin - Gen der polyploiden Kerne von Bombyx mori (McKnight und Miller, 1976) und im Nährzell-Genom von Drosophila melanogaster (Laird und Chooi, 1976). Diese und die vorliegenden BR 2-Spreitungsbefunde sprechen dafür, daß transkriptionell hochaktive Genloci in der Regel immer Orte mit stark erhöhtem B-Polymerasenbesatz sind.

Geht man davon aus, daß BR 2 ca. 10 - 20 pg RNA enthält (Daneholt, 1974, 1975) bzw. 10 - 30 pg (Edström et al., 1978) und die Transkriptionseinheit ca. 3 - 6 µm lang ist, so liegt das Molekulargewicht der BR 2-RNA im Größenbereich von 6 - 10 x 10^6 Daltons. 12 - 20 x 10^6 D (i.e. 18 - 30 KB) ergeben sich demnach für die BR 2-DNA. Das von Daneholt (1972) ermittelte MG für die BR 2-RNA von 15 - 35 x 10^6 D bzw. 13,6 x 10^6 D

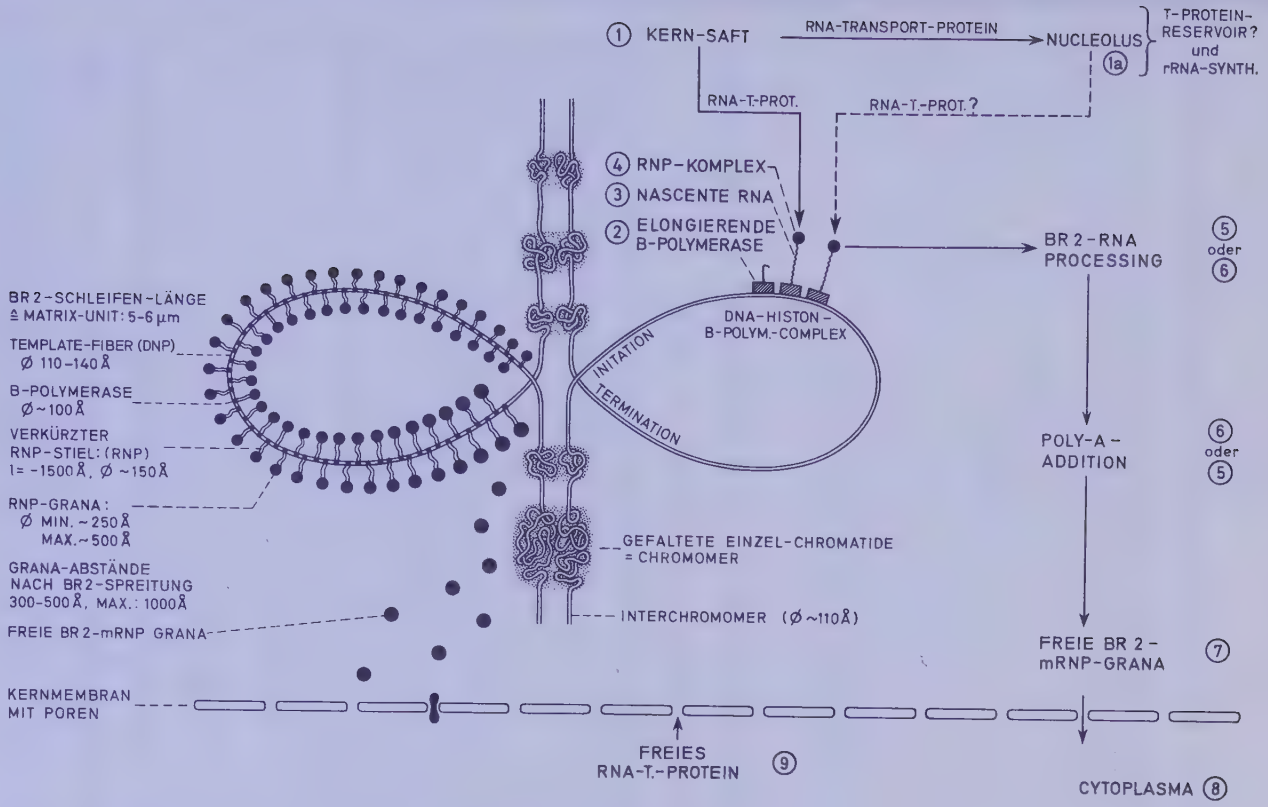


Abb. 40 BALBIANI – RING 2 – Modellsystem der Transkription

Zusammenfassende Gegenüberstellung der elektronenoptischen und biochemischen Daten.

(Daneholt et al., 1977) ist vermutlich zu groß. Auch RNA-Fraktionen anderer Genloci müssen an der Formation des 75 S peaks teilhaben. Die elektronenoptischen und biochemischen Daten sind in Abb. (40) modellmäßig zusammengefaßt.

III Steuerung des (BR-)Puffing mittels DMSO

Der Zusammenhang zwischen Puffing und RNA-Synthese läßt sich durch den Einsatz von Inhibition und Stimulation experimentell angreifen.

Allgemeine Inhibitoren der RNA-Synthese, wie Actinomycin D (Beermann, 1966) bewirken - sofern sie in vivo in Speicheldrüsenkerne überhaupt eindringen können - eine allgemeine Regression des Puffing. Im Gegensatz zu Actinomycin verursacht alpha-Amanitin keine vollständige Hemmung der RNA-Synthese (Beermann 1971). Die Nukleolen-spezifische Polymerase A ist stets aktiv. Was die Empfindlichkeit der RNA-Synthese gegenüber dem Nukleotid-Analog 5.6-dichloro-1- β-D-ribofuranosylbenzimidazol betrifft, so hemmt DRB die Initation der B-Polymerase (Egyházi, 1974, 1976; Sehgal et al., 1976). Auch Cordycepin hemmt die RNA-Synthese in Balbianiringen und Puffs (Diez, 1973). Demgegenüber ist die Wirkung von Hormonen, von Zuckern und von DMSO (Dimethylsulfoxid) differenzierter. Ecdyson inhibiert die RNA-Synthese gar nicht. Dieses Hormon induziert primär lokusspezifische Puffbildungen in den Regionen IV-2B und I-18C (Clever, 1961; Clever et al., 1973). Experimentelle Untersuchungen mit Galaktose ergaben ein verändertes Aktivitätsverhalten von BR 2 und BR 1 und die Stimulation des BR 6 (Beermann, 1973).

DMSO ist bei geringen Konzentrationen nicht toxisch. Es durchdringt lebendes Gewebe (vgl. Szmant, 1971). Enzyme können bei nur geringem Aktivitätsverlust in DMSO-haltigen Medien wirken (Rammler und Zaffaroni, 1967; Rammler, 1971). DMSO wird in vivo zu $DMSO_2$ (Dimethylsulfon) und DMSO (Dimethylsulfid) metabolisiert (vgl. das Review von Wood, 1971). DMSO, ein Nicht-Steroid, ist als aprotisches, dipolares Lösungsmittel in einigen Eigenschaften Wasser sehr ähnlich und bildet neben diesem mit Prote-

inen, Lipiden, Salzen und anderen Substanzen Komplexe.

Der auffälligste Effekt der DMSO-Behandlung (10 %) ist die ungewöhnliche, übermäßige Expansion des BR 3 bei gleichzeitiger Regression von BR 1 und BR 2. Mit der BR 3-Stimulierung geht eine Zunahme an Transkriptionsprodukten einher, d.h. die 3H-Uridin-Markierung entspricht den veränderten Größenverhältnissen. Die frühere Feststellung von Beermann (1962), BR 3 habe ein fibrilläres Transkriptionsprodukt, muß in diesem Zusammenhang korrigiert werden. Charakteristisches und von den Transkriptionsprodukten aller bekannten Balbianiringe abweichendes Produkt sind in nichtstimulierten und stimulierten BR 3, 130 - 200 A messende RNP-Grana (Abb. 31 g). Die geringe Granagröße geht vermutlich auf eine, verglichen mit BR 2 geringe oder fehlende Sequenzredundanz im BR 2-Gen und damit auf eine geringe Genlänge zurück. Das würde erklären, warum Hollenberg (1976) bei der in situ-Hybridisierung keinerlei Markierung mit BR 3 erhielt.

Die mit der BR 3-Vergrößerung parallel gehende Regression von BR 1/BR 2, sowie das mit dem BR 3-overshooting gekoppelte, etwas verspätet einsetzende BR 1-/BR 2-overshooting und die Tatsache, daß BR 1/BR 2 immer erst nach dem "normalen" BR 3-Puffing in der Erholungsphase "normal" dekondensieren, läßt auf eine Aktivitätsbeziehung zwischen den 3 Balbianiringen schließen.

Auf welche Weise die eigentlich unphysiologisch hohe DMSO-Konzentration (10 %) vorübergehend die Transkription der im BR 3 gelegenen Cistrons stimuliert und zur vollständigen, reversiblen Umpolung der BR-Hierarchie im Chromosom IV führt, bleibt der Spekulation vorbehalten. Daß DMSO nicht unmittelbar die Aktivitätserhöhung des BR 3 und später auch vom

BR 1 und BR 2 auslöst, sondern zunächst eine Primärreaktion induziert, eventuell sogar eine Reaktionskette in Gang setzt, wird hier vermutet. Da DMSO biologische Membranen in Richtung einer gesteigerten Ionenpermeabilität beeinflußt (Rammler und Zaffaroni, 1967), so könnten eindringende Ionen als Enzymaktivatoren fungieren (s. "Enzymes", Dixon und Webb, 1964, S. 420 - 429) oder die Genaktivität direkt beeinflussen (s. Kroeger, 1963, 1967 , aber auch die Kritik an der Kroeger-Hypothese von Ashburner und Cherbas (1976)). Verschiedene Wirkungsweisen und Angriffsorte sind DMSO also zuzuordnen.

IV Regulation der RNA-Synthese

Nach Pelling (1964) sind annähernd 300 Banden im Speicheldrüsen-Genom von Chironomus tentans als Puffs aktiv, wenn auch nicht alle zur gleichen Zeit. Chromosom I weist im Mittel 45 Puffs auf. Im zellfreien System inkubierte, native Speicheldrüsenchromosomen I zeigen nach kurzfristigem Aufquellen und unmittelbar folgender Rekondensation 60 - 80 markierte Banden. Wahrscheinlich sind also in vitro alle bekannten Puffs zur gleichen Zeit syntheseaktiv. Das könnte darauf hinweisen, daß isolierte Riesenchromosomen am DNP-Template gebundene RNA-Polymerasen enthalten, die im zellfreien System unter geeigneten Milieubedingungen alle aktiv werden.

Beweise für die Enzymaktivität liefert neben der Empfindlichkeit der Reaktion gegenüber alpha-Amanitin (s. Abb. 30 und Cochet-Meilhac und

Chambon, 1974) die Salzabhängigkeit. Monovalente Kationen führen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration und der Konzentration an Mg^{++}, zu unterschiedlicher Chromosomen-Konformation und differentiellem B-Polymerasen-Verhalten. Im Konzentrationsbereich 0.15 - 0.2 M NaCl (oder KCl) mittels 10 - 15 mM $MgCl_2$ überkondensierte Chromosomen (Abb. 8 b), zeigen mit Ausnahme der entfalteten Balbianiringe und Nukleolen kaum Markierung (Abb. 29 d). Niedriges Salz (0.03 M NaCl, 2 mM Mg^{++} oder Mn^{++}) sowie hohes Salz (0.34 - 0.4 M NaCl, 2 mM Mg^{++} oder Mn^{++}) bewirken beide (1) ein Auflockern der Chromosomenstruktur und (2) eine Stimulation der RNA-Synthese (vgl. Abb. 24, 26, 28, 29 a-c). Das könnte bedeuten, daß über den chromosomalen Kondensationsgrad Polymerasenaktivitäten (passiv) regulierbar sind. So sind auch die B-Polymerasen im Gegenwart hoher Mg^{++}-Konzentrationen, i.e. 10 - 15 mM (0.15 - 2.0 M NaCl), vielleicht nur wegen der übermäßigen Kondensation der Chromatiden funktionsgehemmt bzw. -inaktiv (Abb. 29 d).

Die Interpretation unterschiedlicher B-Polymerasenaktivität in niedrigem und hohem Salz dekondensierter Speicheldrüsenchromosomen läuft auf die Postulierung zweier Aktivitätszustände hinaus. Offensichtlich können B-Polymerasen auch in niedrigem Salz RNA synthetisieren. Wie aus der Markierungsintensität in Autoradiographien hervorgeht, polymerisiert das B-Enzym in diesem Ionenmilieu, verglichen mit der Syntheseleistung in hohem Salz, wenig. Isolierte B-Polymerasen von Drosophila melanogaster besitzen im Konzentrationsbereich 0.18 - 0.25 M KCl; 0.5 - 1.0 mM Mg^{++} oder Mn^{++} ihr Salzoptimum (Greenleaf und Bautz, 1975). Trotz der offenen Frage, ob und inwieweit isolierte B-Polymerasen in vitro veränderte Eigenschaften annehmen, kann das genannte Salzoptimum sicherlich als Orientierungswert dienen. Demnach wäre die geringe Ionenkonzentration verant-

wortlich für die geringere Polymerisationsleistung des B-Enzyms an dekondensierten Riesenchromosomen.

In Einklang mit den Befunden von Tata und Widnell (1964); Pogo et al., (1966); Zylber und Penman (1971) und anderen, zeigen Riesenchromosomen in hohem Salz (0.34 - 0.4 M NaCl) ebenfalls eine drastische Erhöhung ihrer RNA - Synthese. Hingegen fällt die B-Enzymaktivität bei der Transkription nackter DNA über 0.25 M KCl rapide ab (Greenleaf und Bautz, 1975). Dieser Sachverhalt legt auch im Fall von Chironomus die Möglichkeit nahe (s. Lindigkeit et al., 1974; Cox et al., 1973 und andere), daß hohes Salz aus isoliertem Chromatin jene Proteine freisetzt, die bei physiologischer Salzkonzentration (0.15 M NaCl) die B-Polymerasenaktivität einschränken. Die Steigerung der RNA-Synthese polytäner Chromosomen könnte man dann so deuten, daß RNA-Polymerasen wegen des unvollkommenen oder fehlenden funktionellen Zusammenspiels mit Proteinen über die jeweilige Genregion hinauswandern und längere Chromatidenstrecken als üblich transkribieren.
60 Sekunden bis 2 Minuten in 0.35 - 0.4 M NaCl dekondensierte Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus sollten aber kein so drastisch verändertes Proteinmuster haben wie isoliertes Chromatin in Gegenwart von 0.6 M NaCl (Hameister, 1977) oder 0.4 % Sarkosyl (Franke et al., 1977; Gariglio et al., 1976; Green et al., 1975) oder 1 mg/ml Heparin. Außer Histon H 1 dissoziieren alle übrigen Histonfraktionen erst ab 0.6 M NaCl (Ohlenbusch et al., 1966). Nur Nicht-Histone gehen in 0.34 M NaCl teilweise schon in Lösung (Johns et al., 1975). Die Ablösung von Proteinen allein kann folglich nicht der Grund für die gesteigerte RNA-Synthese polytäner IS-Chromosomen sein. Schließlich kommen Reassoziationen von Proteinen an das Template auch in hohem Salz vor (Clark und Felsenfeld, 1971). Da

bei der Chromosomen-Inkubation im zellfreien System keine freien B-Polymerasen zur Verfügung sind und hohes Salz jegliche B-Polymerasen-Initation unterbindet (Hyman und Davidson, 1970), so müssen endogene B-Polymerasen in der vermehrten RNA-Synthese wirksam sein. Für diese Folgerung sprechen desgleichen Befunde von Hameister (1977) an polytänen Kernen.

Die Fragen, (1) ob die RNA-Synthese ohne typisches Puffing stattfinden kann, (2) ob das typische Puffing ohne RNA-Synthese möglich ist und (3) ob die Markierung zusätzlicher Banden nur auf einer durch hohes Salz/Chromosomendekondensation ausgelösten, allgemeinen Genaktivierung basiert, sind mit solchen Experimenten allein nicht zu entscheiden. Die experimentelle Änderung der Aktivität von Puffs und Balbianiringen führt hier weiter.

Wie bereits ausgeführt (s. III), sind bei den mit DMSO behandelten Chironomus-Larven beträchtliche Größenschwankungen der 3 Balbianiringe (vom overshooting bis zur Regression) im Speicheldrüsen-Genom zu beobachten. Dies kann als morphologischer Ausdruck für Aktivitätsunterschiede verstanden werden, d.h. Variationen des Puffing reflektieren die physiologische Situation im jeweiligen Tier.
Da kollabierte BR normalerweise frei von nennenswerter Markierung sind (s. Abb. 36, 37, 38, 39) könnte man meinen, daß RNA-Synthese ohne typisches Puffing nicht erfolgt. Andererseits findet sich bei IS-Chromosomen aus DMSO-behandelten Larven nach der Salz-induzierten Chromosomen-Dekondensation im Bereich der kollabierten BR sehr deutlich eine schmale "Querscheibe" hoher Markierungsdichte (s. Abb. 36 i - l). Danach scheint die RNA-Synthese auch ohne typische Puffbildung möglich. Diese Diskrepanz kann wie folgt interpretiert werden:

Fast alle früheren Befunde zeigen, daß die Hemmung der B-Polymerasen-Aktivität z.B. durch Actinomycin D (Beermann, 1966) oder alpha-Amanitin (Beermann, 1971) zur Regression der BR und Puffs führt. In in vivo kollabierten BR und Puffs findet keine RNA-Synthese statt, so daß sich die Frage ergibt, ob der Faltungsgrad der Chromatiden keine Initation weiterer B-Polymerasen an das Template und keine Elongation dort bereits gebundener B-Polymerasen erlaubt. Die Phase, in welcher die sterische Hemmwirkung der Chromatidenfaltung vermutlich aufgehoben wird, wird hier primäres Puffing genannt und vom sekundären Puffing, der Phase mit typischem Puffing, unterschieden. Ein cytologisches Anzeichen für eine gesonderte Reaktion (primäres Puffing), das auch dann stattfinden kann, wenn die RNA-Synthese durch Actinomycin D inhibiert ist, wäre die Ansammlung von nicht-basischen Proteinen an zukünftigen Puffs, wie sie Berendes (1969; Berendes und Beermann, 1969) beschrieben hat. Einen weiteren Hinweis liefern die eigenen Befunde über die Situation in vitro.

Im zellfreien System führt die Dekondensation des gesamten Chromosoms zur allgemeinen Derepression der B-Polymerasen in allen Puffs. Die induzierte Auflockerung der Chromatiden in vitro könnte sehr wohl eine Voraussetzung für das Einsetzen der RNA-Synthese in den (primären) Puffs sein. Mit dieser Annahme ist ein Einklang, daß überkondensierte Chromosomen im zellfreien System keinen oder nur sehr geringen Einbau aufweisen. Nach dem primären Puffing sind die B-Polymerasen anscheinend von selbst imstande, die Chromomeren-Fibrillen aufzufalten. Daß es im zellfreien System zur Bildung von BR und Puffs nicht kommt, ist vielleicht als Folge des Fehlens von Verpackungsproteinen zu verstehen. Wie schon Beermann (1966, 1967) vermutete, sollte neben der Dekondensation die Ansammlung von Transkriptionsprodukten (in vivo) schrittweise zum typischen Puffing, al-

so Balbianis "renflement" führen (s. Abb. 37).

Das Ausbleiben der 3H-Uridinmarkierung in manchen Kernen trotz unveränderter Puffsituation, ist im Gegensatz zu der von Pelling (1964) angenommenen Entkopplung zwischen Puffing und RNA-Synthese, ein Artefakt im Sinne unzureichender Permeabilität der Kernmembran. Isolierte, nicht überkondensierte Riesenchromosomen bauen die radioaktive Vorstufe stets ein. Daß das sekundäre Puffing im Normalfall ohne gleichzeitige RNA-Synthese stattfinden kann, ist auszuschließen.

Auf Grund der ständigen Bindung von B-Polymerasen befinden sich alle potentiellen Puffregionen offensichtlich ständig im Zustand "unterschwelliger Bereitschaft", d.h. sie sind präaktiv und können im Bedarfsfall sofort genetische Information abgeben. Daß kollabierte BR-Regionen noch immer stärker markiert sind, als andere Chromosomenabschnitte, wird als Konsequenz der höheren B-Polymerasendichte in den BR-Regionen angesehen. Abgesehen von den BR-Regionen, sind nach Markierungspulsen von 30 - 60 Sekunden *in vitro*, die Silberkörner nahezu ausschließlich über den Banden lokalisiert (s. Abb. 27 b/c; 28 a-d). Solche autoradiographischen Resultate für *Chironomus* und die Dehnungsexperimente mit markierten *Drosophila*-Chromosomen von Ananiev und Barsky (1978) widersprechen der Hypothese von Crick (1971) und der Ansicht von Zhimulev und Belyaeva (1975); Jamrich et al., (1977), daß das essentielle genetische Material sich in den Interbanden befinde. Allerdings könnte die Bandenmarkierung auch die Folge der höheren B-Polymerasen-Konzentration in den Banden sein. Schließlich findet sich bei längeren Markierungspulsen (2 - 5 Min.) bei isolierten *Chironomus*-Chromosomen auch in den Interbanden stets (eine wesentlich schwächere) Markierung (s. Abb. 29 a, b). Ob es

sich hierbei lediglich um Streuaktivität oder um Polymerasenaktivität handelt, kann wohl erst die elektronenoptische Analyse endgültig klären.

D ZUSAMMENFASSUNG

1. Ein Verfahren wurde entwickelt, polytäne, somatische Interphase-Chro - mosomen aus larvalen Speicheldrüsen von Chironomus spec. als Ganze nativ zu isolieren. Isolierte und in Speicheldrüsen befindliche Rie - senchromosomen wurden strukturell sowie funktionell untersucht und gegenübergestellt.
2. Die charakteristische Musterausbildung in situ und in vitro befind - licher Riesenchromosomen beruht auf der aperiodischen Abfolge 0.1 - 0.6 µm dicker Banden. 0.2 - 0.3 µm dicke Banden kommen in Messungen Glutaraldehyd-fixierter Chromosomen am häufigsten vor. Die Hypothese, daß das bandenspezifische Chromomer als kleinste Struktureinheit poly- täner Chromosomen durch die differentielle Knäuelung der Chromatide entsteht, wurde elektronenoptisch bestätigt. In den 0.05 - 0.3 µm dicken Interbanden sind die Chromatiden anscheinend frei von jegli - chem Paarungskontakt. Sie zeigen keine erkennbare Knäuelung. Der Chro- matidendurchmesser (110 - 130 A) ändert sich beim Übergang von den Banden in die Interbanden - Regionen nicht. Unterschiede in der Packungsdichte der Chromatiden kommen vor.
3. In Spreitungspräparaten nativ isolierter Chromosomen findet man in den Banden Schleifen unterschiedlichen Entfaltungsgrades. Sie stellen kei- ne Transkripte dar. Diese Konfigurationen sind Übèrgangsformen zwi- schen eng gefalteten Chromomeren - Fibrillen und den in Balbianiringen und anderen Puffs beobachteten Chromomeren-Schleifen. Im Chroma - tidenverlauf kommen diese 0.8 - 8.4 µm langen Chromomeren - Schleifen in Abständen von 0.6 - 3 µm vor. Ihr DNA-Gehalt errechnet sich auf 7.2 - 75 Kilobasen (KB). Im hypotonischen Milieu geht die Stabilität

und Faltung der Chromomeren-Schleifen in den Banden polytäner Chromosomen verloren. Vermutlich durch den Verlust von Histon H 1. Als ein Nicht - Histon ist RNA - Polymerase B (II) mit der Chromatide assoziiert.

4. In vivo fixierte Chromosomen zeigen in Banden, Interbanden, Puffs und Nukleolen 110 - 130 A dicke Elementarfibrillen. Demgegenüber erscheinen die gespreiteten Chromosomenfasern bis zu 300 A dick und zeigen eine deutliche Nukleosomenstruktur. In Ultradünnschnitten von in situ fixierten Chromosomen sind unter physiologischen Salzbedingungen keine Nukleosomen sichtbar.
5. Balbianiringe (BR 1, BR 2, BR 6) repräsentieren wahrscheinlich, wie andere Puffs, solitäre Transkriptionseinheiten. Sie unterscheiden sich von ribosomalen Cistrons durch größere Länge (3-6 µm) und die spärlichere Polymerasenbesetzung. BR 1, 2, 6 besitzen 300 - 500 A große RNP-Grana als Transkriptionsprodukte. BR 3 unterscheidet sich von allen bekannten Balbianiringen durch kleinere, 130 - 200 A messende RNP-Grana. BR 3 ist ein Sonderfall. Das Molekulargewicht der BR 2-RNA liegt schätzungsweise im Größenbereich von 6-10 x 10^6 Daltons.
6. Mit DIMETHYLSULFOXID kann das BR 2, 1, 3 - Puffing in lebenden Chironomus-Larven spezifisch verändert werden. BR 3 entwickelt sich während der 2. - 3. Stunde vorübergehend zum größten BR (overshooting). BR 2 und BR 1 kollabieren währenddessen. Von der 4. Stunde an sind das extreme Puffing (overshooting) von BR 1 und BR 2 und das " normale " Puffing von BR 3 typisch. Nach dem DMSO-Entzug kollabieren vorübergehend alle BR. BR 3 beginnt in der Erholungsphase immer zuerst, BR 2 immer zuletzt mit dem Puffing. Zwischen den drei Balbianiringen besteht eine Aktivitätsbeziehung. Mit der DMSO - Stimulation des BR 3

nimmt die Anzahl seiner Transkriptionsprodukte zu.

7. Chromosomen IV in DMSO-behandelten Larven zeigen über kollabierten Balbianiringen keine 3H - Uridinmarkierung. Auch in experimentell überkondensierten IS - Chromosomen sind die B(II) - Polymerasen funktionsgehemmt bzw. -inaktiv. Niedriges Salz (0.03 M NaCl) und hohes Salz (0.34 - 0.4 M NaCl) hingegen führen beide im zellfreien System zur Auflockerung der Chromomeren. Solche künstliche Dekondensation isolierter Chromosomen IV aus DMSO - behandelten Larven mit kollabierten BR 1, 2, 3 führt zur Derepression der B (II) - Polymerasen. Auch alle anderen Puffs nativ isolierter Chromosomen I aus behandelten und nichtbehandelten Chironomus-Larven sind nach künstlicher De - und Rekondensation in vitro auf einmal markiert. Riesenchromosomen besitzen also auf dem DNP-Template gebundene B(II)-Polymerasen. Vor allem hohes Salz (0.34 - 0.4 M NaCl) stimuliert die Polymerasenaktivität. In Gegenwart von alpha-Amanitin bleibt die Bandenmarkierung aus. Die Polymerasenaktivität ist mit Toluidinblau in nativen IS - Chromosomen als metachromatische Färbung in situ nachweisbar. Das Markierungsverhalten isolierter Chromosomen spricht für die Lokalisation des wesentlichen genetischen Materials in den Banden.

Der in vivo stattfindende Puffing-Prozeß läßt sich hypothetisch in zwei Teilreaktionen untergliedern:

Bei der Initialreaktion der Genaktivierung, dem primären Puffing , wird die sterische Hemmwirkung der Chromatiden-Faltung spezifisch aufgehoben, was zu einem örtlich begrenzten Auflockern der Chromatide im jeweils zu aktivierenden Chromomer führt. Das typische Puffing findet in dieser Phase nicht statt. Nach dem primären Puffing falten die B(II) - Polymerasen anscheinend autonom das jeweilige Chromomer weiter auf. Dieses typische, sekundäre Puffing wird als das Re -

sultat des Transkriptionsprozesses selbst aufgefaßt. Daß das sekun - däre Puffing im Normalfall ohne gleichzeitige RNA-Synthese stattfindet, ist auszuschließen.

E MATERIAL und METHODEN

1. Haltung und Präparation der Tiere

Untersucht wurden Laborzuchten der europäischen Population von Chironomus (Camptochironomus) tentans (Fabr.), sowie Chironomus tentans (Hedy)aus Kanada und aus Finnland.
In Plastikschüsseln kann man die Larven bei einem Hell-Dunkel-Wechsel (15:9 Stunden) in niedrig stehendem Wasser bei 18°C halten. Gute Zuchtergebnisse und eine zufriedenstellende Chromosomenmorphologie ließen sich dann erzielen, können die Larven in handelsüblichem Zellstoff und verrottetem Laub heranwachsen, vgl. Beermann (1952). Verrottetes Erlenlaub wird von den Larven für den Tubenbau verwendet und auch gern gefressen. In Abständen von 3-5 Tagen wurden zermahlene Brennesselblätter beigefüttert. Auch letztere wurden vor ihrer Verwendung zunächst mit heißem Wasser überbrüht. 1-2 Tage später gießt man den Brei durch ein feines Sieb, um verklumptes Material abzusondern. In den Zuchtschüsseln setzt sich so behandeltes Futter in wenigen Stunden auf dem Boden ab. "Laub-Wasser" hat pH 5-6.
Unterbleibt die Zusatzfütterung mit Brennesselblättern, ist die Chromoso - menmorphologie schlecht. Verfüttert man mehrere Tage alten, gärenden Brennesselbrei, dann verursachen Faulgase (wie Methan) im Laufe der Zeit ebenfalls eine unzureichende Chromosomenmorphologie.
Massenzuchten wurden zusätzlich belüftet(Pressluft), kleinere Zuchtschüsseln nicht.

Die Präparation der Larven und die Herstellung von Chromosomen-Quetsch - präparaten für die vergleichenden, morphologischen Untersuchungen folgt der bei Beermann (1952) gegebenen Beschreibung. In der Hämolymphe explantierte Speicheldrüsen wurden nach ihrer Fixierung in Äthanol-Eisessig (3:1 - 3 Min.), 5- 10 Min. in Kamin-Essigsäure(KE) gefärbt, 5 Min. in Essig - säure (45%) differenziert, vom Sekretpropf abgestreift und gequetscht.

2. Autoradiographie

Für in vivo-Untersuchunge mittels Autoradiographie wurde 3H-Uridin den Larven oral injiziert. 1 µl entspricht dabei einer Aktivität von 1 µCi. Das Spritzen geschah bei Zuchtraumtemperatur (i.e. 18°C), freihändig unter einem Stereomikroskop. 20-40 Tiere kann man in 60 Min. spritzen. Instrumentell sind 2 Pinzetten (TUBIS 5 oder 5a) und zu Mikrokapillaren (über der Flamme) ausgezogene 5 µl MICROCAPS (Drummond, U.S.A.) notwendig. Diese sind ihrerseits einem mit Paraffinöl gefüllten Schlauch aufgesetzt, der mit einer HAMILTON - Spritze (Typ 710) gekoppelt ist. Allein durch leichtes Fingerpressen des Schlauches wird die Injektionsgeschwindigkeit und die zu verabreichende Flüssigkeitsmenge (0.5-3.0µl) reguliert. Alle Substanzen wurden in 15 mM Sö - rensen-Phosphat-Puffer, pH 7.0 oder ungepuffert verabreicht.

Gegenüber anderen Markierungsverfahren (z.B. Pelling, 1964) bietet die orale Injektion den methodischen Vorteil, leichter und mit weniger Aufwand ausführbar zu sein. Wichtiger ist es, daß die radioaktive Vorstufe die paari - gen Speicheldrüsen unmittelbar umspült und in diese diffundiert, bevor die

Verteilung und damit die Verdünnung im Körperlumen erfolgt. Innerhalb von 30 Sekunden dringt tritiiertes Uridin in die Speicheldrüsen ein. Verletzte Tiere kamen nie zur Untersuchung.

Isolierte Kerne und nativ isolierte Riesenchromosomen aus Speicheldrüsen überträgt man auf gelatinisierte Objektträger, wo sie zunächst "gewaschen", d.h. mehrmals mit frischem IS-Medium (ohne Detergens NONIDET P 40; Shell Chemical Co) überschichtet werden. Anschließend inkubiert man die Kerne und freien Riesenchromosomen in den (in Tab. 5-7) aufgeführten Inkubations-Medie

Die Fixierung explantierter Drüsen, isolierter Kerne und kondensierter Riesenchromosomen erfolgte mit Äthanol-Eisessig (3:1). Aufgequollene Chromosomen und IS-Kerne wurden mit 2-10% Formaldehyd in der jeweils verwendeten Sal lösung bei pH 7.3 denaturiert. Die Fixierung dekondensierter Chromosomen ist nicht frei von Problematik. Oft kommt es zur Strukturabwandlung während der Fixierung. Der Fixierungsschritt wird beeinflußt von der vorausgegangenen Salzbehandlung. Es ist erforderlich, die Salzkonzentration im Fixativ mit den jeweiligen in vitro-Bedingungen abzustimmen.

In Essigsäure (45%) gequetschte Speicheldrüsen durchlaufen nach ihrer Vereisung in flüssigem Stickstoff (oder auf CO_2-Trockenschnee) und dem Absprengen des Deckglases, ebenso wie die fixierten Kerne und IS-Chromosomen, eine Äthanolreihe (100-10%). Deren wässerigen Anteil ist durch handelsübliches Formalin ersetzt. Gequollene Kerne und Chromosomen wurden in eine auf- und absteigende Äthanol-Formalin-Reihe geführt (10-100-10% - Aqua dest.).

Die Lokalisation der radioaktiven Isotope in den Riesenchromosomen geschah nach der von Pelc (1956) beschriebenen "stripping film technique". Kodak AR 10 diente als Standardmaterial. Nach Auftragen und Lufttrocknung des AR 10, wurden die Präparate immer über granuliertem Phosphorpentoxid (P_2O_5) GRANULOPENT der Fa.Roth, Stuttgart, in schwarzen Kunststoffbehältern bei 4-8°C, für 4-90 Tage exponiert.

Für die Umsetzung des latenten in ein reales Bild, diente Kodak D 19b als Hydrochinon-Entwickler (3 Min. bei 20°C). Längere Entwicklungszeiten ergaben vor allem eine Zunahme der Untergrund-Markierung. Nach der Zwischenwässerung wurden die Objektträger in 30% Natriumthiosulfat 5 Min. eingestell Nachfolgend 15 Min. in Aqua dest. gespült, 1-3 Min. in Mayers Hämalaun (MERC gefärbt und luftgetrocknet. In EUPARAL (Fa.Serva, Heidelberg) eingebettete Präparate dienten für die mikroskopische Betrachtung.

Folgende radioaktiv markierten Verbindungen des RADIOCHEMICAL CENTRE AMERSHAM (Großbritannien bzw. Braunschweig (BRD)) kamen zur Verwendung:

(5 - 3H) URIDIN	18 - 30 Ci/mMol
(5,6 - 3H) URIDIN	40 - 60 Ci/mMol
(5 - 3H) URIDIN 5'-TRIPHOSPHAT	17 Ci/mMol
(5,6 - 3H) URIDIN 5'-TRIPHOSPHAT	49 Ci/mMol

3. Elektronenoptische Präparationen

a) Ultramikrotomie

Explantierte Speicheldrüsen sowie nativ isolierte Riesenchromosomen, fixiert

man in frisch angesetztem Glutaraldehyd (2 oder 6.5%; GA reinst für die Elektronenmikroskopie nach Anderson, Fa. Serva, Heidelberg) in:

a) Sörensen-PO_4-Puffer (0.1M, pH 7.0) für 60 Min. bei 4-10°C, oder in
b) PIPES-Puffer (0.05M, pH 6.8), 0.25M Saccharose, 0.5mM $MgCl_2$, 0.5mM $CaCl_2$.

Einige Drüsen wurden anschließend über Nacht mit einer Puffer-Saccharose-Lösung (6.5%) gewaschen, um nicht gebundenes Glutaraldehyd zu entfernen. Anschließend wurden die Speicheldrüsen mit 2% OsO_4 (in 6.5% Saccharose) für 2-3 Stunden nachfixiert und in ARALDIT eingebettet. Andere Drüsen wurden erst 1-2 Minuten mit Essigsäure (45%) behandelt und danach in der Säure auf silikonisierten Objektträgern gequetscht und vereist. Nach Absprengen des Deckglases durchlaufen solche Quetschpräparate eine Methanol-Formalin-Reihe (100 - 10% - je Stufe 5 Min.). Vorkontrastiert wurde 60 Min. in wässerigem Uranylacetat (2% - in der Dunkelheit). Anschließend färbt man die Chromosomen 1-3 Min. in Mayers Hämalaun (Merck). Es folgt die Dehydratisierung in Äthanol (10-100%). Über Propylenoxid als Intermedium kommen die Chromosomen in DURCUPAN ACM (= ARALDIT der Fa.Fluka - Schweiz). Die Polymerisation des Araldits dauert bei 60°C, 1-2 Tage. Schließlich wurden mit frischem Einbettungsmittel gefüllte Gelatinekapseln umgekehrt über die ausgesuchten Riesenchromosomen gestülpt. Nach der Polymerisation des A. in den Kapseln, sprengt man die noch erwärmten Kapseln auf CO_2-Trockenschnee ab. An einem Ultrathom III (Fa. LKB-Stockholm) wurden die Chromosomen 400 - 800 A dünngeschnitten. So gewonnene Serienschnitte kommen auf kohleverstärkte, mit Formvar (0.24%) befilmte Cu-Trägernetze (200 mesh) oder Ni-Netzchen. Kontrastiert wurde auf Parafilm:

a) 90 Min. mit 2% Uranylacetat in 50% Äthanol und
b) 10 Min. mit zentrifugiertem, alkalischem Bleicitrat (nach Karnovsky, 1961).

Mit Hilfe eines AGFA-PRADOVIT 250 auf eine Leinwand projezierte Negative dienten in der Regel für die Messungen der Banden, Interbanden, Chromatiden und Balbianiring-RNP-Grana.

b) Raster-Elektronenmikroskopie

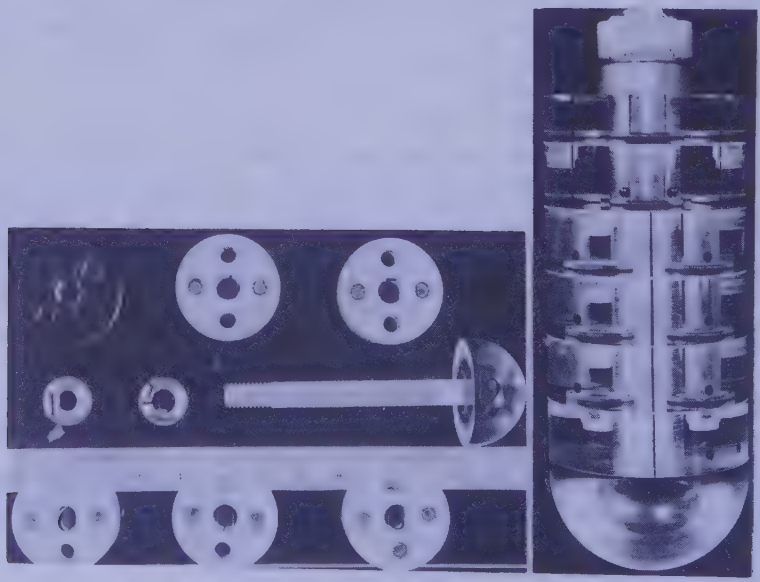
Nativ isolierte Riesenchromosomen transferiert man auf Deckgläschen von 12,5 mm Durchmesser. Dort werden die Chromosomen nach einer Adsorptionszeit von 2-4 Min. 1 Stunde mit 2.5% Glutaraldehyd in 0.1 M Sörensen-PO_4 (pH 7.3) fixiert. Nachfixiert wurde mit Osmiumtetroxid (OsO_4 - 1%) im gleichen Puffer und anschließend mit Aqua dest. gewaschen. Nach einer Äthanol-Amylacetat-(30 - 100/50 : 50/100) oder Aceton-Entwässerung (30-100%) wurden die Präparate einer "Kritischen-Punkt-Trocknung" mit CO_2 unterzogen und mittels Gold-Kathoden-Zerstäubung eine 100-200 A dicke Schicht aufgedampft. Die Betrachtung der Präparate geschah an einem SIEMENS - AUTOSCAN (ETEC- U.S.A.) bei 20 KEV.

c) Mikro-Zentrifugation

Zur M. nativ isolierter Chromosomen dienten von Strohmaier (1967) entwickelte Zentrifugenzellen.
Sechs um einen Zentralschaft übereinander angeordnete, einzeln gegeneinander verstellbare Segmente erlauben entsprechend ihrer jeweiligen Position, isolierte Chromosomen direkt auf befilmte Netzchen zu zentrifugieren. Zum Zel-

lenbau s. die nebenstehende Abbildung. Die Schraubenmuttern 1 und 2 dienten zur Arretierung; das Segment 3 mit vier durchgehenden Bohrungen als Lade- bzw. Abschlußscheibe. Die Segmente 4-7 besitzen nur 2 Durchbohrungen, zusätzlich aber zwei Netzkammern. Alle Segmentoberflächen sind mit Teflonfolie überzogen, so daß das gegenseitige Verschieben der gefüllten Segmente ohne Flüssigkeitsverlust möglich ist.

Die Präparation entspricht im Prinzip der von Miller und Bakken, (1972) für "morphological studies of transcription" beschriebenen Methodik.
Während des Vorquellens der nativen Riesenchromosomen sind die Bohrungen des obersten Segmentes direkt über dem Lineament angeordnet. Jede Bohrung enthält bidestilliertes Wasser, das mit 0.01 M Borat-Puffer, pH 9.22 (MERCK) auf pH 7-8.5 eingestellt ist. 1-20 in dieses Medium übertragene Riesenchromosomen quellen schon während des Absinkens auf und sind innerhalb von 60 Sekunden konturlos. Derartiges Vorquellen dauert 1-10, maximal 30 Minuten; gelegentlich wurde die Lösung aufgewirbelt. Anschließend justiert man das oberste Segment über die Netzkammern des zweiten Segmentes und zentrifugiert die Chromosomen durch 0.1 M Saccharose, 10% Formalin, pH 8.5, direkt auf die Netzchen. Dazu dienten ein BECKMAN Spinco SW 25-1 Schwingbecher-Rotor (4-6 Min. bei 2500 G) oder eine HETTICH Universal II-Zentrifuge. Die Netzchen wurden dann mit 0.4% KODAK Photo-Flo (pH 8.5) abgespült, luftgetrocknet, mit alkoholischer Phosphorwolframsäure (2%) kontrastiert und nach dem Abspülen in 95% Äthanol neuerlich luftgetrocknet. Untersucht wurden alle Spreitungspräparate bei 40 und/oder 60 KEV an einem Philips EM 300, bzw. bei 60 KEV an einem Zeiss EM 9. SCIENTIA-Film von Agfa Gevaert



diente als Negativmaterial für die photographischen Aufnahmen.

d) Spreitung durch Grenzflächenspannung an der Wasser-Luft-Interphase

Die Spreitung geschieht in Teflontrögen. Auf einem silikonisierten Glasstab sammelt man in einem Tropfen bidestillierten Wassers (s.o.) etwa 10 bis 20 native Speicheldrüsenchromosomen. Nach dem Vorquellen (3-30 Min.) erfolgt die Spreitung beim Eintauchen des Glasstabes in und dem Abflotten der Chromosomen auf die wässerige Hypophase gleichen pH-Wertes (i.e.7-8,4). Durch Auftupfen mit 1.Min. beglimmten, also hydrophilisierten Netzchen wurden die gespreiteten Chromatiden abgehoben. Zur Fixierung und Kontrastierung s.(b).

Für die Negativdarstellung einiger Schnitt- und Spreitungsbilder dienten die unsensibilisierten Feinkornplatten "DIA REPRO HART" bzw. "NORMAL" der PERUTZ-Photowerke(Agfa), München.

4. Experimentelle Veränderungen des Puffmusters durch DMSO in vivo

20 Larven des 4. Stadiums setzt man in eine mit 200 ml 10% DIMETHYLSULFOXID p.A. $(CH_3)_2SO$ (MERCK); 0.06 % NaCl und Aqua dest gefüllte Glasküvette. Die Behandlung der Larven geschah bei 18°C. Da DMSO in Verbindung mit Wasser exotherm reagiert, so wurde die Lösung unmittelbar vor dem Experiment angesetzt und augenblicklich auf 18°C abgekühlt. Die Übereinstimmung mit der Zuchtraumtemperatur ist selbstverständlich notwendig, um durch Hydratationswärme induzierte, überlagernde Temperaturschock-Effekte (s.Beermann, 1952; Yamamoto, 1971) zu vermeiden.

Für die Stimulation z.B. des BR 3 bleiben die Tiere 150-180 Min. in der Lösung. Danach wandelt sich die BR-Hierarchie (s.Abb.10 und die Erläuterungen im Text).
Die Stimulation ist abhängig vom physiologischen Zustand der Larven. 1-2 Tage vor dem Experiment mit frischem Wasser und Futter versehene Larven zeigen die beschriebene Abwandlung im BR-Muster deutlich.

Die DMSO-Wirkung ist dadurch reversibel, überträgt man behandelte Larven in frisches Wasser(Leitungswasser : 0.06% NaCl-haltiges Aqua dest, 1:3) s.Abb. (11). Die zeitabhängigen Änderungen im Balbianiring-Muster während der DMSO-Phasen(+) und(-) wurden in KE-Quetschpräparaten überprüft. In Anlehnung an Beermann(1971,1973) wurden in der Regel 3 Klassen des Puffing unterschieden: (++) Maximale Expansion, (+) Intermediäres Puffing, (-) Schwaches oder kein Puffing.
Für autoradiographische Untersuchungen wurden explantierte Speicheldrüsen aus DMSO-behandelten Larven in dem in Abs.2 angegebenen Ionenmilieu inkubiert, vgl. auch Tab.(10).

Voraussetzung für die Induktion des Puffs IV-5C in vivo sind:
a)8-15 Std. 10% DMSO bei 18°C.
b)Unmittelbar zu Beginn der Erholungsphase werden den regungslosen Larven
- ihrer Größe gemäß - 1-3 µl Aqua dest oral injiziert.
Der nach jeder längeren DMSO-Behandlung immer vorhandene Sekretpropf in der Larvenmundöffnung, läßt sich leicht mit einer Uhrmacherpinzette entfernen.

2 - 4 Stunden nach der Wasser-Injektion ist der Puff IV- 5C in der Regel ausgebildet. Vorauseilendes und verzögertes Puffing kommen vor.

F LITERATURVERZEICHNIS

Ananiev, E.V. and Barsky, V.E.,
Localization of RNA synthesis sites in the 18-3C Region of the Drosophila melanogaster X Chromosome.
Chromosoma 65: 359-371; (1978)

Angelier, N. and Lacroix, J.C.,
Complexes de transcription d'origines nucléolaire et chromosomique d'ovocytes de Pleurodeles waltlii et P. poireti (Amphibiens, Urodèles).
Chromosoma 51: 323-335; (1975)

Ashburner, M. and Cherbas, P.,
The control of puffing by ions - the Kroeger Hypothesis: a critical review.
Molecular and Cellular Endocrinology 5: 89 - 197; (1976)

Balbiani, E.B.,
Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les larves de Chironomus.
Zool. Anz. 4: 637 - 641; 662 - 666; (1881)

Bauer, H.,
Der Aufbau der Chromosomen aus Speicheldrüsen von Chironomus Thummi Kiefer (Untersuchungen an den Riesenchromosomen der Dipteren I).
Z. Zellforsch. 23: 280 - 313; (1935)

Bauer, H.,
Structure and arrangement of salivary gland chromosomes in Drosophila species.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 22: 216 - 222; (1936)

Bauer, H. und Beermann, W.,
Die Polytänie der Riesenchromosomen.
Chromosoma 5: 139 - 198; (1952)

Beermann, W.,
Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von Chironomus tentans.
Chromosoma 5: 139 - 198; (1952)

Beermann, W.,
Chromosomal differentiation in insects.
In: Developmental Cytology, (D. Rudnick, ed.); S. 83 - 103
New York: Ronald (1959)

Beermann, W.,
Riesenchromosomen (Protoplasmatologia VI, D)
Wien: Springer-Verlag; (1962)

Beermann, W.,
Differentiation at the level of the chromosomes.
In: Cell differentiation and morphogenesis. S. 24 - 54
Amsterdam: North-Holland Publ. Co. (1966)

Beermann, W.,
Gene Action on the level of the chromosome.
in: Heritage from Mendel; S. 179 - 201
The University of Wisconsin Press
Madison, Milwaukee, and London (1967)

Beermann, W.,
Effect of α-amanitine on puffing and intranuclear RNA-synthesis
in Chironomus salivary glands.
Chromosoma 34: 152 - 167; (1971)

Beermann, W.,
Chromomeres and Genes
in: Results and Problems in Cell Differentiation, (Beermann, ed.)
Berlin: Springer-Verlag; (1972) S. 1 - 33

Beermann, W.,
Directed changes in the pattern of Balbiani-Ring puffing
in Chironomus: Effects of a sugar treatment.
Chromosoma 41: 297 - 326; (1973)

Beermann, W. and Bahr, G.F.,
The submicroscopic structure of the Balbiani-Ring.
Exp. Cell Res. 6: 195 - 201; (1954)

Behrens, M.,
Hoppe-Seylers Z. physiologische Chemie 209: 59; (1932)

Benyajati C. and Worcel, A.,
Isolation, characterization, and structure of the folded
interphase genome of Drosophila melanogaster.
Cell 9: 393 - 407; (1976)

Berendes, H.,
Factors involved in the expression of gene activity in
polytene chromosomes.
Chromosoma 24: 418 - 437; (1968)

Berendes, H.,
Polytene chromosome structure at the submicroscopic level.
Chromosoma 29: 118 - 130; (1970)

Berendes, H.D. and Meyer, G.F.,
A specific chromosome element, the telomere of Drosophila
polytene chromosomes.
Chromosoma 25: 184 - 197; (1968)

Berendes, H., Alonso, C., Helmsing, P.J., Leenders, H.J.
and Derksen J.,
Structure and function in the genome of Drosophila hydei.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38: 645 - 654; (1973)

Birnstiel, M.L., Weinberg, E.S. and Pardue M.L.,
Evolution of 9S mRNA sequences. S 75 - 93
In: Molecular cytogenetics, (B.A. Hamkalo, J. Papaconstantinou, eds.)
New York: Plenum Press (1973)

Bonner, J., Dahmus, M.E., Fambrough, D , Huang, R.C., Marushige, K. and Tuan, Y.H.,
The biology of isolated chromatin.
Science 159: 47 - 56; (1968)

Bradbury, E.M., Danby, S.E., Rattle, W.E. and Giancotti, V.,
Studies on the role and mode of operation of the very-Lysine-rich Histone H 1 (F 1) in Eukaryote chromatin.
Eur. J. Biochem. 57: 97 - 105; (1975)

Bram, S. and Ris, H.,
On the structure of nucleohistone.
J. Mol. Biol. 55: 325 - 336; (1971)

Bridges, C.B.,
Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of Drosophila melanogaster.
J. Hered. 26: 60 - 64; (1935)

Busch, H.,
In: Methods in Enzymology, Vol. XII
Nucleic Acids (L. Grossman and K. Moldave, eds.)
Part A, S. 421 - 448
New York: Academic Presse (1967)

Calvin, M., Kodani, M. and Goldschmidt, R.,
Effects of certain treatments on the morphology of salivary gland chromosomes and their interpretation.
Proc. Natl. Acd. Sci. USA 26: 340 - 349; (1940)

Cedar, H.,
Transcription of DNA and Chromatin with calf thymus RNA polymerase B in vitro.
J. Mol. Biol. 95: 257; (1975)

Chalkley, R. and Jensen, R.H.,
A study of the structure of isolated chromatin.
Biochemistry 7: 4380 (1968)

Clark, R.J. and Felsenfeld, G.,
Structure of chromatin.
Nature New Biology 229: 101 (1971)

Clever, U.,
Genaktivitäten in den Riesenchromosomen von Chironomus tentans und ihre Beziehungen zur Entwicklung. I. Genaktivierungen durch Ecdyson.
Chromosoma 12: 607 - 675; (1961)

Clever, U., Clever, I., Storbeck, I. and Young, N.,
The apparent requirement of two hormones, α- and β-Ecdysone, for molting induction in insects.
Developmental Biology 31: 47 - 60; (1973)

Clever, U. und Karlson, P.,
Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans durch Ecdyson.
Exp. Cell Res. 20: 623 - 626; (1960)

Cochet-Meilhac, M. and Chambon, P.,
Animal DNA-dependent RNA polymerases. 11. Mechanism of the inhibition of RNA polymerases by amatoxins.
Biochem. biophys. Acta (Amst.) 353: 160 - 184; (1974)

Comings, D.E. and Okada, T.A.,
Some aspects of chromosome structure in Eukaryotes.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38: 145 - 153; (1973)

Cox, R.F.,
Transcription of high-molecular-weight RNA from hen-oviduct chromatin by bacterial and endogenous form B RNA polymerases.
Europ. J. Biochem. 39: 49 - 61; (1973)

Cox, R.F., Haines, M.E. and Carey, N.H.,
Modification of the template capacity of chick-ovidukt chromatin for form-B RNA polymerase by estradiol.
Eur. J. Biochem. 32: 513 - 524; (1973)

Crick, F.,
General model für chromosomes of higher organisms.
Nature 234: 25 - 28 (1971)

Daneholt, B.,
Giant RNA transcript in a Balbiani ring.
Nature (Lond.) New Biol. 240: 229 - 232; (1972)

Daneholt, B.,
Transfer of genetic information in polytene cells.
Int. Rev. Cytol. 39: 417 - 462; (1974)

Daneholt, B.,
Transcription in polytene chromosomes.
Cell 4: 1 - 9; (1975)

Daneholt, B. and Edström, J.E.,
The content of deoxyribonucleic acid in individual polytene chromosomes of Chironomus tentans.
Cytogenetics 6: 350 - 356; (1967)

Daneholt, B. and Hosick, H.,
Evidence for transport of 75 S RNA from a discrete chromosome region via nuclear sap to cytoplasm in Chironomus tentans.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 442 - 446; (1973)

Daneholt, B., Case, S.T., Derksen, J., Lamb, M.M., Nelson, L. and Wieslander, L.,
The size and chromosomal location of the 75 S RNA transcription unit in Balbianiring 2.
Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 42, Im Druck (1977)

Derksen, J., Trendelenburg, M.F., Scheer, U. and Franke, W.W.,
Spread chromosomal nucleoli of Chironomus salivary glands.
Exptl. Cell Res. 80: (1973)

Dick, C. and Johns, W.,
The effect of two acetic containing fixatives on the histone content of calf thymus desoxyribonucleoprotein and calf thymus tissue.
Exp. Cell Res. 51: 626 - 632; (1968)

Diez, J.L.,
Effect of cordycepin (3'-desoxyadenosin) on polytene chromosomes of Chironomus pallidivittatus salivary glands.
Chromosoma 42: 345 - 358; (1973)

DuPraw, E.J.,
DNA and chromosomes.
New York: Holt, Rinehart and Winston (1971)

DuPraw, E.J. and Rae, P.M.M.,
Polytene chromosome structure in relation to the "folded fiber" concept.
Nature (London) 212: 598 - 600; (1966)

Edström, J.E.,
Polytene chromosomes in studies of gene expression.
In: The cell nucleus (H. Busch, ed.) Band II, S. 292 - 332.
New York: Academic Presse (1974)

Edström, J.E., Lindgren, S., Lönn, U. and Rydlander, L.,
Balbiani Ring RNA content and half-life in nucleus and cytoplasm.
Chromosoma: Im Druck (1976)

Egyházi, E.,
A tentative initiation inhibitor of chromosomal heterogenous RNA synthesis.
J. Mol. Biol. 84: 173 - 183; (1974)

Egyházi, E.,
Quantitation of turnover and export to the cytoplasm of hnRNA transcribed in the Balbiani rings.
Cell 7: 507 - 515; (1976)

Enzymes
Dixon and Webb (eds.) S. 420 - 429; (1964)
London: Longmans, Green and Co LTD

Felsenfeld, G.,
Chromatin
Nature 271: 115 - 122; (1978)

Finch, J.T., Noll, M. and Kornberg, R.D.,
Electron microscopy of defined lenght of chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3320 - 3322; (1975)

Foe, V.E., Wilkinson, L.E. and Laird, C.D.,
Comparative organization of active transcription units
in Oncopeltus fasciatus.
Cell 9: 131 - 146; (1976)

Gabrusewycz-Garcia, N. and Garcia, A.M.,
Studies on the fine structure of puffs in Sciara coprophila.
Chromosoma 47: 385 - 401; (1974)

Gariglio, P., Buss, J. and Green, M.A.,
Sarcosyl activation of RNA polymerase activity in mitotic
mouse cells.
FEBS Letters 44: 330 - 333; (1974)

Gay, H.,
Nucleoplasmatic relations in Drosophila
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21: 257 - 269; (1956)

Gilmour, R.S., Widnass, J.D., Affara, N. and Paul, J.,
Control of transcription of the globin gene.
J. Cell Physiol. 85: 449 - 458; (1975)

Glancy-D'Angelo, E.,
Micrurgical studies on Chironomus salivary gland chromosomes.
Biol. Bull. 90: 71 - 87; (1946)

Glätzer, K.H.,
Visualization of gene transcription in spermatocytes of
Drosophila hydei.
Chromosoma 53: 371 - 379; (1975)

Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S. and
Singh, R.M.,
Hydrogen ion buffers for biological research.
Biochemistry 5: 467 - 477; (1966)

Green, M.H., Buss, J. and Gariglio, P.,
Activation of nuclear RNA polymerase by Sarkosyl.
Europ. J. Biochem. 53: 217 - 225; (1975)

Greenleaf, A.L. and Bautz, E.K.F.,
RNA Polymerase B from Drosophila melanogaster larvae. Purification
and partial characterization.
Eur. J. Biochem. 60: 169 - 179 (1975)

Griffith, J.D.,
Chromatin structure: Deduced from a minichromosome.
Science 187: 1202 - 1203; (1975)

Grossbach, U.,
Chromosomen-Aktivität und biochemische Zelldifferenzierung in den Speicheldrüsen von Camptochironomus.
Chromosoma 28: 136 - 244; (1969)

Grossbach, U.,
Chromosome puffs and gene expression in polytene cells.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38: 619 - 627; (1973)

Hameister, H.,
RNA synthesis in isolated polytene nuclei from Chironomus tentans.
Chromosoma 62: 217 - 242; (1977)

Hearst, J.E. and Botchan, M.,
The eukaryotic chromosome.
Ann. Rev. Biochem. 39: 151 - 182; (1970)

Heumann, H.G.,
Electron microscopic observations of the organization of chromatin fibers in isolated nuclei of the rat liver.
Chromosoma 47: 133 - 146; (1974)

Hollenberg, C.P.,
Proportionate representation of rDNA and Balbiani ring DNA in polytene chromosomes of Chironomus tentans.
Chromosoma 57: 185 - 197; (1976)

Holmes, D.S., Mayfield, J.E., Sander, G. and Bonner, J.,
Chromosomal RNA: Its properties.
Science 177: 72 - 74; (1972)

Honjo, T. and Reeder, R.H.,
Transcription of Xenopus chromatin by homologous ribonucleic acid polymerases: Aberrant synthesis of ribosomal and 5S ribosomal acid.
Biochemistry 13: 1896 - 1899; (1974)

Huang, R.C. and Bonner, J.,
Histone bound RNA, a component of native nucleohistone.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54: 960 - 967; (1965)

Huberman, J.A.,
Structure of chromosome fibers and chromosomes.
Ann. Rev. Biochem. 42: 355 - 378; (1973)

Hyman, R.W. and Davidson, N.,
Kinetics of the in vitro inhibition of transcription by actinomycin.
J. Mol. Biol. 50: 421 - 438; (1970)

Jamrich, M., Greenleaf, A.L. and Bautz, E.K.F.,
Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2079 - 2083; (1977)

Jamrich, M., Haars, R., Wulf, E. and Bautz, F.A.,
Correlation of RNA polymerase B and transcriptional activity
in the chromosomes of Drosophila melanogaster.
Chromosoma 64: 319 - 326; (1977)

Johns, E.W., Goodwin, G.H., Walker, J.M. and Sanders, C.,
Chromosomal proteins related to histones. S. 96 - 112
In: The structure and function of chromatin.
Ciba Foundation Symposium 28 (Fitzsimmons, D.W. and Wolstenholme, G.eds.)
Elsevier North Holland (1975)

Kalnins, V.I., Stich, H.F. and Bencosme, S.A.,
Fine structure of the nucleolar organizer of salivary
gland chromosome of Chironomids.
J. Ultrastruct. Res. 11: 282 - 291; (1964)

Karnovsky, M.J.,
Simple methods for "staining with lead" at high
pH in electron microscopy.
J. Biophy. Biochem. Cytol. 11: 729 - 732; (1961)

Kaufman, B.P. and McDonald, M.R.,
Organization of the chromosome.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21: 233 - 244; (1956)

Keyl, H.-G.,
Lampbrush chromosomes in spermatocytes of Chironomus.
Chromosoma 51: 75 - 91; (1975)

Kellermayer, M., Olson, M.O.I., Smetana, K., Daskal, I. and Busch, H.,
Effects of various ionic media on extraction of soluble nuclear
proteins and on nuclear ultrastructure.
Exp. Cell Res. 85: 191 - 204; (1974)

Kiknadze, I.I., Perov, N.A. and Chentsov, Yu. S.,
Electron microscopic studies on the polytene chromosomes
of Chironomus thummi salivary glands. I. Ultrastructural mapping.
Chromosoma 55: 91 - 103; (1976)

Koltzoff, N.K.,
The structure of the chromosomes in the salivary glands
of Drosophila.
Science 80: 312 - 313; (1934)

Kretsinger, R.H.,
Calcium - binding proteins.
Annual Rev. of Biochemistry 45: 239 - 266; (1976)

Kroeger, H.,
Chemical nature of the system controlling gene activities in
insect cells.
Nature (London) 200: 1234 - 1235; (1963)

Kroeger, H.,
The control of puffing by ions: a reply
Molecular and Cellular Endocrinology 7: 105 - 110; (1977)

Kroeger, H. and Müller, G.,
Control of puffing activity in three chromosomal segments of explanted salivary gland cells of Chironomus thummi by variation in extracellular Na^+, K^+ and Mg^{2+}.
Exptl. Cell Res. 82: 89 - 94; (1973)

Laird, C.D., Wilkinson, L.E., Foe, V.E. and Chooi, W.Y.,
Analysis of chromatin-associated fiber arrays.
Chromosoma 58: 169 - 192; (1972)

Lambert, B.,
The chromosomal distribution of Balbiani Ring DNA in Chironomus tentans.
Chromosoma 50: 193 - 200;(1975)

Lambert, B.,
Repeated DNA sequences in a Balbiani ring
J. molec. Biol. 72: 65 - 75; (1975)

Lampert, F.,
Coiled supercoiled DNA in critical point dried and thin sectioned human chromosome fib s.
Nature New Biology 234: 187 -188; (1971)

Langendorf, H., Siebert, G., Lorenz, I., Hannover, R. and Beyer, R.,
Kationenverteilung in Zellkern und Cytoplasma der Rattenleber
Biochem. Z. 335: 273 - 284; (1961)

Langendorf, H., Siebert, G., Kesselring, K. and Hannover, R.,
High nucleo-cytoplasmic concentration gradient of chloride in rat liver.
Nature (London) 209: 1130 - 1131; (1966)

Lezzi, M.,
Cytochemische Untersuchungen an Puffs isolierter Speicheldrüsen-Chromosomen von Chironomus.
Chromosoma 21: 89 - 108; (1967)

Lezzi, M.,
Differential gene activation in isolated chromosomes.
Int. Rev. Cytol. 29: 127 - 168; (1970)

Lezzi, M. and Gilbert, L.I.,
Differential effects of K^+ and Na^+ on specific bands of isolated polytene chromosomes of Chironomus tentans.
J. Cell Sci. 6: 615 - 628; (1970)

Lezzi, M. and Robert, M.,
Chromosomes isolated from unfixed salivary glands of Chironomus.
In: Developmental Studies on giant chromosomes. S. 35 - 57
Results and Problems in Cell Differentiation (Beermann, W. ed.)
Berlin: Springer-Verlag (1972)

Lindigkeit, R., Bellmann, K., Fenske, H., Böttger, M., Holtzhauer, M. and Eichhorn, I.,
Effects of the removal of F 1-Histone on the conformation and on the transcription process.
FEBS Letters 44: 146 - 152; (1974)

Lowman, F.G.,
Electron microscope studies of Drosophila salivary gland chromosomes.
Chromosoma 8: 30 - 52; (1956)

Mähr, R., Lezzi, M. and Eppenberger, H.M.,
Mass isolation of polytene nuclei from Chironomus salivary glands.
J. Cell Sci. 27: 1 - 12; (1977)

McCarthy, B.J., Nishiura, J.T., Doenecke, D., Nasser, D.S. and Johnson, C.B.,
Transcription and chromatin structure.
Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 38: 763 - 771; (1973)

McKnight, S.L. and Miller, O.L. Jr.,
Ultrastructural patterns of RNA synthesis during early embryogenesis of Drosophila melanogaster.
Cell 8: 305 - 319; (1976)

McKnight, S.L., Sullivan, N.L. and Miller, O.L. Jr.,
Visualization of the silk fibroin transcription unit and nascent silk fibroin molecules on polyribosomes of Bombyx mori.
Prog. in Nucleic Acid Res. and Mol. Biology
Academic Press (1976)

McKnight, S.L. and Miller, O.L.Jr.,
Electron microscopic analysis of chromatin replication in the cellular Blastoderm Drosophila melanogaster embryo.
Cell 12: 795 - 804; (1977)

Meyer, G.F. and Hennig W.,
The nucleolus in primary spermatocytes of Drosophila hydei.
Chromosoma 46: 121 - 144;

Meyer, G.F. and Hennig, W.,
Molecular aspects of the fertility factors in Drosophila.
In: The functional anatomy of the spermatozoon (Afzelius, B.A., ed.)
S. 69 - 75
New York and Oxford: Pergamon Press (1974)

Miller, O.L.Jr. and Beatty, B.R.,
Visualization of nucleolar genes.
Science 164: 955 - 957; (1969)

Miller, O.L. and Bakken, A.H.,
Morphological studies of transcription.
Acto endocr. Suppl. 168: 155 - 177 (1972)

Mirsky, A.E., Burdick, C.J., Davidson, E.H. and Littau, V.C.,
The role of Lysine-rich Histone in the maintenance of
chromatin structure in metaphase chromosomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. 61: 592 - 597; (1968)

Mott, M.R. and Callan, H.G.,
An electron-microscope study of the lampbrush chromosomes
of the newt Triturus cristatus.
J. Cell Sci. 17: 241 - 261; (1975)

Muller, H.J.,
On the dimensions of chromosomes and genes in dipterian
salivary glands.
Amer. Naturalist 69: 405 - 411; (1935)

Muramatsu, M.,
Isolation of nuclei and nucleoli.
In: Methods in Cell Physiology. (Prescott, ed.) S. 195 - 228, Vol. 6
New York: Academic Press (1970)

Naora, H., Naora, H., Mirsky, A.E. and Allfrey, V.G.,
Magnesium and calcium in isolated cell nuclei.
J. Gen. Physiol. 44: 713 - 742; (1961)

Noll, M., Thomas, J.O. and Kornberg, R.D.,
Preparation of native chromatin and damage caused by shearing.
Science 187: 1203 - 1206; (1975)

Ohlenbusch, H.H., Olivera, B.M., Tuan, D. and Davidson, N.,
Selective dissoziation of histones from calf thymus nucleoprotein.
J. Mol. Biol. 68: 115; (1967)

Olins, A.L. and Olins, D.E.,
Spheroid chromatin units (v-Bodies).
Science 183: 330; (1973)

Olmsted, J.B. and Borisy, G.G.,
Ionic and nucleotide requirements for microtubule
polymerization in vitro.
Biochemistry 13: 2996 - 3005;(1975)

Oudet, P., Gross-Bellard, M. and Chambon, P.,
Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin
structure is a repeating unit.
Cell 4: 281 - 300; (1975)

Painter, T.S.,
An experimental study of salivary chromosomes.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 9: 47 - 54; (1941)

Palmer, L.G. and Civan, M.M.,
Intracellular distribution of free potassium in
Chironomus salivary glands.
Science 188: 1321 - 1322; (1975)

Panitz, R.,
Über die Rolle der Chromosomen bei der Informations-
übertragung in höheren Organismen.
Biol. Zbl. 87: 545 - 565; (1968)

Pardon, J.F. and Wilkins, M.H.F.,
A supercoil model for nucleohistone.
J. Mol. Biol. 68: 115; (1972)

Pardon, J.F., Richards, B.M. and Cotter, R.I.,
X-Ray-Diffraction studies on oriented nucleohistone gels.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38: 75 - 81 (1973)

Pardue, M.L., Brown, D.D. and Birnstiel, M.L.,
Location of the genes for 5 S ribosomal RNA in Xenopus leavis.
Chromosoma 42: 191 - 203; (1973)

Poulson, D.F. and Metz, C.W.,
Studies on the structure of nucleolus-forming regions and related
structures in the giant salivary gland chromosomes of Diptera.
J. Morphol. 63: 363 - 395; (1938)

Pelc, S.R.,
The stripping-film technique of autoradiography.
Int. J. appl. Radiat. 1: 172; (1956)

Pelling, C.,
Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by the
incorporation of uridine labeled with tritium.
Nature (London) 184: 655 - 656; (1959)

Pelling, C.,
Ribonukleinsäure-Synthese der Riesenchromosomen
Autoradiographische Untersuchungen an Chironomus tentans.
Chromosoma 15: 71 - 122; (1964)

Pelling, C.,
A replicative and synthetic unit - the modern concept of the chromomere.
Proc. Roy. Soc. London, B, 164: 279 - 289; (1966)

Pelling, C.,
Synthesis of nucleic acids in giant chromosomes.
In: Progress in Biphysics and Molecular Biology, S. 237 - 270
(J.A.V. Butler and D. Noble, eds.)
Oxford and New York: Pergamon Press (1969)

Pelling, C.,
Transcription in giant chromosomal puffs.
In: Developmental Studies on giant chromosomes.
Results and Problems in Cell Differentiation (Beermann, W. ed.)
Berlin: Springer-Verlag (1972)

Plagens, U., Greenleaf, A.L. and Bautz, E.K.F.,
Distribution of RNA polymerase on Drosophila chromosomes as studied by indirect immunofluorescence.
Chromosoma 59: 157 - 165; (1976)

Pogo, A.O., Allfrey, V.G. and Mirsky, A.E.,
Evidence for increasing DNA template activity in regenerating liver nuclei.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56: 550 - 557; (1966)

Pogo, A.O., Littau, V.C., Allfrey, V.G. and Mirsky, A.E.,
Modification of ribonucleic acid synthesis in nuclei isolated specific divalent cations.
Proc. Natl. Acad. Sci. 57: 743 - 751; (1966)

Pooley, A.S., Pardon, J.F. and Richards, B.M.,
The relation between the unit thread of chromosomes and isolated nucleohistone.
J. Mol. Biol. 85: 553 - 549; (1974)

Pomerai de, D.I., Chesterton, C.J. and Butterworth, P.H.W.,
Preparation of Chromatin
Variation in the template properties of chromatin dependent on the method of preparation.
Eur. J. Biochem. 46: 461 - 471; (1974)

Pothier, L., Gallagher, J., Wright, C.E. and Libby, P.R.,
Histones in fixed cytological preparations of Chinese hamster chromosomes demonstrated by immunofluorescence.
Nature 225: 350 - 352; (1975)

Rae, P.,
Whole mount electron microscopy of Drosophila salivary chromosomes.
Nature (London) 212: 139 - 142; (1966)

Rammler, D.H. and Zaffaroni, A.,
Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 141: 13 - 23; (1967)

Rammler, D.H.,
Use of DMSO in enzyme-catalyzed reactions.
In: Dimethyl Sulfoxid S. 189 - 206
(Jacobs, S.W., Rosenbaum, E.E. and Wood, D.C. eds.)
New York: Marcel Dekker (1971)

Renz, M., Nehls, P. and Hozier, L.,
Involvement of histone H 1 in the organization of the chromosome fiber.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 1879 - 1883; (1977)

Retief, E.A. and Rüchel, R.,
Histones removed by fixation.
Exp. Cell Res. 106: 233 - 237; (1977)

Ris. H. and Crouse, H.,
Structure of the salivary gland chromosomes of Diptera.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 31: 321 - 327; (1945)

Ris, H.,
Fine structure of chromosomes.
Proc. Roy. Soc. London, B, 164: 246 - 257; (1966)

Ris, H. and Kubai, D.F.,
Chromosome structure.
Ann. Rev. Genet. 4: 263 - 294; (1970)

Ris, H.,
Chromosomal structure as seen by electron microscopy.
In: The structure and function of Chromatin
Ciba Foundation Symposium 28, S. 7 - 28
Elsevier North Holland (1975)
(Fitzsimmons, D.W. and Wolstenhome, G.E.W. eds.)

Ristow, H. and Arends, S.,
A system in vitro for the synthesis of RNA and Protein by
isolated salivary glands and by nuclei from Chironomus larvae.
Biochemica et Biophysica Acta, 157: 178 - 186; (1968)

Robert, M.,
Einfluß von Ionenstärke und pH auf die differentielle Dekondensation der Nukleoproteide isolierter Speicheldrüsen-Zellkerne und -Chromosomen von Chironomus thummi.
Chromosoma 36: 1 - 33; (1971)

Robert, M.,
Isolation and manipulation of salivary gland nuclei and chromosomes.
In: Methods in Cell Biology (Prescott, D. ed.) Kap. 19, 377-390, Vol. IX
Academic Press (1975)

Rose, J.R.,
The state of magnesium in cells as estimated from the
adenylate kinase equilibrium.
Proc. Natl. Acad Sci. 61: 1079 - 1086 (1968)

Scheer, U., Franke, W.W., Trendelenburg, M.F. and Spring, H.,
Classification of loops of lampbrush chromosomes according to the
arrangement of transcriptional complexes.
J. Cell Sci. 22: 503 - 519; (1976)

Scheer, U., Trendelenburg, M.F., Krohne, G. and Franke, W.W.,
Length and patterns of transcriptional units in the amplified
nucleoli of oocytes of Xenopus laevis.
Chromosoma 60: 147 - 167; (1977)

Seghal, P.B., Darnell, J.E. Jr. and Tamm, I.,
The inhibition by DRB (5,6-diochloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole)
of hnRNA and mRNA production in HeLa cells.
Cell 9: 473 - 480; (1976)

Siebert, G. und Langendorf, H.,
Ionenhaushalt im Zellkern.
Naturwissenschaften 57: 119; (1970)

Silver, L.M. and Elgin, S.C.R.,
A method for determination of the in situ distribution of chromosomal proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 423 - 427; (1976)

Spelsberg, T.C. and Hnilica, L.S.,
Proteins of chromatin in template restriction.
I. RNA synthesis in vitro.
Biochem. Biophys. Acta, 228: 202 - 211; (1971)

Spring, H., Trendelenburg, M.F., Scheer, U., Franke, W.W. and Herth, W.,
Structural and biochemical studies of the primary nucleus of two green algae species Acetabularia mediterranea and Acetabularia major.
Cytobiologie 10: 1 - 65; (1974)

Sorsa, M.,
Ultrastructure of the polytene chromosome in Drosophila melanogaster with special reference to electron microscopic mapping of chromosome 3 R.
Ann. Acad. Sci. Fenn. A. IV, 151: 1- 18; (1969)

Sorsa, V.,
Organization of Chromomeres.
Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 38: 601 - 608; (1973)

Sorsa, M. and Sorsa, V.,
Electron microscopic observations on interband fibrils in Drosophila salivary chromosomes.
Chromosoma 22: 32 - 41; (1967)

Sorsa V. and Sorsa, M.,
Ideas on the linear organization of chromosomes received by electron microscopic studies of strechted salivary chromosomes.
Ann. Acad. Sci. fenn. A IV 134: 3 - 16; (1968)

Stein, H.,
RNA synthesis with giant chromosomes of isolated Drosophila hydei nuclei as a correlate to the experimentally altered chromosome morphology.
Exp. Cell Res. 103: 1 - 14;(1976)

Stevens, B.J. and Swift, H.,
RNA transport from nucleus to cytoplasm in Chironomus salivary glands.
J. Cell Biol. 31: 55 - 77; (1966)

Strohmaier, K.,
A new procedure for quantitative measurements of virus particles in crude preparations.
J. of Virology, 1: 1074 - 1081; (1967)

Szmant, H.H.,
Chemistry of DMSO
In: Dimethyl Sulfoxide, S. 1- 87
(Jacob, S.W., Rosenbaum, E.E. and Wood, D.C. eds.)
New York: Marcel Dekker (1971)

Tata, J.R., Hamilton, M.J. and Cole, R.D.,
Membrane phospholipids associated with nuclei and chromatin: melting profile, template activity and stability of chromatin.
J. Mol. Biol. 67: 247 - 264; (1972)

Veloso, D., Guynn, R.W., Oskarson, M. and Veech, R.L.,
The concentration of free and bound magnesium in rat tissues.
J. Biol. Chemistry 248: 4811 - 4819; (1973)

Weinmann, R. and Roeder, R.G.,
Role of DNA-dependent RNA polymerase III in transcription of the tRNA and 5 S genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 1790 - 1794; (1974)

Tata, J.R. and Widnell, C.C.,
Evidence for two DNA-dependent DNA polymerase activities in isolated rat-liver nuclei.
Biochem. biophys. Acta 87: 531 - 533; (1964)

Wilson, G.N., Steggles, A.W. and Weinhaus, A.W.,
Strand-selective transcription of globin genes in rabbit erythroid cells and chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 4835 - 4839; (1975)

Wood, D.C.,
Fate and metabolism of DMSO.
In: Dimethyl Sulfoxide. S. 133 - 145
(Jacob, S.W. and Rosenbaum, E.E. and Wood, D.C. eds.)
New York: Marcel Dekker (1971)

Woodcock, C.L.F.,
Ultrastructure of inactive chromatin.
J.Cell. Biol. 59: 368a; (1973)

Wolfe, L.S.,
The effect of prefixation on the diameter on chromosome fibers isolated by the Langmuir trough-critical point method.
J. Cell. Biology 37: 610 - 620; (1968)

Wolfe, S.L.,
In: The biological basis of medicine (Bittar, E.E., ed.), S. 3 - 42
London: Academic Press (1969)

Wolfe, S.L. and Grim, J.N.,
The relationship of isolated chromosome fibers to the fibers of the embedded nucleus.
J. Ultrastructure Res. 19: 382 - 397; (1967)

Wolstenholme, D.R., Dawid, I.B. and Ristow, H.,
An electron microscopic study of DNA molecules from Chironomus tentans and Chironomus thummi.
Genetics 60: 759 - 770; (1968)

Worcel, A. and Benyajati, C.,
Higher order coiling of DNA in chromatin.
Cell 12: 83 - 100; (1977)

Wray, W. and Stubblefield, E.,
A new method for the rapid isolation of chromosomes, mitotic apparatus, or nuclei form mammalian fibroblasts at near neutral pH.
Exp. Cell Res. 59: 469; (1970)

Yamamoto, H.,
Heat-shock induced puffing changes in Balbianirings.
Chromosoma 32: 171 - 190; (1970)

Yasuzumi, G.,
Ultrastructure of the salivary gland chromosome as revealed by electron microscopy.
Experientia Vol. XIII/8: 313 - 314; (1957)

Ycas, J.,
De novo origin of periodic proteins.
J. Mol. Evol. 2: 17 - 27; (1972)

Zasloff, M. and Felsenfeld, G.,
Analysis of in vitro transcription of duck reticulocyte Chromatin using mercury-substituted ribonucleoside triphosphates.
Biochemistry 16: 5135 - 5145; (1978)

Zhimulev, I.F. and Belyaeva, E.S.,
H^3-uridine labelling patterns in the Drosophila salivary gland chromosomes X, 2R and 3L.
Chromosoma 49: 219 - 231; (1975)

Zirkin, B.R. and Wolfe, S.L.,
Fiber ultrastructure and dimensions in thin-sectioned chromatin.
J. Ultrastructure Res. 39: 496 - 508; (1972)

Zylber, E.A. and Penman, S.,
Products of RNA polymerase in HeLa cell nuclei.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 2861 - 2865; (1971)

Lebenslauf

Am 05.04.1944 wurde ich als Sohn des Studienrates Heinz Sass und seiner Ehefrau Käthe, geb. Welteke, in Frankfurt/Oder geboren.

Von 1950 - 1957 besuchte ich die Grundschule in Frankfurt/Oder. Bis zum Zeitpunkt der Flucht meiner Mutter aus der DDR in die BRD -mein Vater gilt seit eines Kriegseinsatzes im Jahre 1944 als vermißt- hatte ich das 7. Schuljahr erreicht. In der BRD selbst war wegen der Einweisungen in verschiedene Flüchtlingslager und des damit verbundenen, häufigen Ortswechsels zuerst kein regelmäßiger und meistens kein Schulbesuch gewährleistet. Von Ostern 1958 - 1964 besuchte ich das Aufbaugymnasium in Herchen/Sieg (Krs. Siegburg); auf Grund eines neuerlichen Ortswechsels meiner Familie dann eine weiterführende Schule in Kassel. Dort habe ich im Jahre 1966 ein "Externes Abitur", also die Reifeprüfung in 10 Fächern, abgelegt.

Zum Wintersemester 1966/67 begann ich das Studium der Biologie und Chemie an der Universität Marburg, im Herbst 1969 setzte ich das Studium an der Universität Tübingen fort. Die Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien im Fach Biologie bestand ich im Wintersemester 1972. Im Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Beermann, fertigte ich von 1972 - 1973 die Wissenschaftliche Arbeit an. Das Staatsexamen im Fach Chemie bestand ich im Wintersemester 1972/73. Seit dem Frühjahr 1973 bis 1978 arbeitete ich an der Dissertation im Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Beermann, unter der Anleitung von Herrn Professor Beermann.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren:

Bayer	Möhres
Beermann	Nultsch
Bünning	Pfeil
Dimroth	Rüdorff
Engelmann	Seidel
Kessel	Schwemmle
Mägdefrau	v. Stosch
Metzner	Walcher